

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO  
DE COUMARINAS E LAPACHOL  
EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**Dora Sofia Afonso Pinto**

DISSERTAÇÃO  
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA  
2013



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO  
DE COUMARINAS E LAPACHOL  
EM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**Dora Sofia Afonso Pinto**

Tese orientada por: Prof.<sup>a</sup> Doutora Lisete Fernandes<sup>1, 2, 3</sup>

Orientador Interno: Prof. Doutor Rui Malhó<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras

<sup>2</sup> BioFiG, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

<sup>3</sup> Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa

<sup>4</sup> Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

**MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA**

**2013**



FUNDAÇÃO CALOUSTE GULBENKIAN  
Instituto Gulbenkian de Ciência

O trabalho conducente a esta tese foi desenvolvido na íntegra no Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, e no âmbito de uma colaboração entre o grupo de investigação Yeast Stress e a Doutora Milena BP Soares (Centro de Investigação Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, e Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brasil).

Este trabalho não foi escrito abrigo do novo Acordo Ortográfico.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Instituto Gulbenkian de Ciências, local onde o trabalho conducente a esta Tese foi desenvolvido, pelas excelentes condições de trabalho.

À Doutora Lisete Fernandes, por me ter aceitado no seu grupo de investigação e proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho. Pelos conhecimentos transmitidos, disponibilidade e imensa paciência que sempre demonstrou.

Um agradecimento muito especial à minha colega Ana Amorim, pelos conhecimentos partilhados, paciência e enorme disponibilidade, que foram sem qualquer dúvida, um apoio imprescindível para a conclusão deste trabalho.

À Doutora Milena BP Soares, pela colaboração e simpatia.

Aos meus colegas de trabalho na Maternidade Dr. Alfredo da Costa e British Hospital XXI, pela compreensão e disponibilidade que sempre demonstraram.

Aos meus queridos amigos, em especial Ana, Gonçalo, Gabi e Jorge por todos os conselhos, boa disposição e apoio.

Por fim, à minha querida família, pais, irmãos e sobrinhos, pelo amor, paciência e enorme compreensão com que sempre encararam os grandes períodos de ausência.

## SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E GLOSSÁRIO

### Símbolos

Δ – indica a inativação completa de um gene por deleção total ou parcial

: : – na descrição do genótipo, indica uma substituição/inserção de gene

### Abreviaturas

ABC – do inglês *A*TP – *b*inding *c*assette

Bpt1 – do inglês *b*ile *p*igment *t*ransporter

bZIP – do inglês *b*asic *l*eucine *z*ipper

CCD – do inglês *c*harge-*c*oupled *d*evice

DAPI – do inglês *d*iamidino-2-*p*henyl*i*ndole

DIC – do inglês *d*ifferential *i*nterference *c*ontrast *m*icroscopy

DO – *d*ensidade *ó*ptica

DMSO – *d*imetil sulfoxido

EM – do inglês *e*lectron-*m*ultiplying

e.g. – do latim *e*xempli *g*ratia (por exemplo)

ERO – espécies reactivas de *o*xigénio

Flr1 – do inglês *f*luconazole *r*esistance

GFP – do inglês *g*reen *f*luorescent *p*rotein

GSH –  $\gamma$ -glutamyl-cysteinil-glicina (glutathiona)

GSH1 –  $\gamma$ -glutamyl-cisteína sintetase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogénio

HO<sup>•</sup> - radical hidroxilo

i.e. – do latim *i*d *e*st (isto é)

MAT – do inglês *m*ating *t*ype

MDR – do inglês *m*ultidrug *r*esistance

MSF – do inglês *m*ajor *f*acilator *s*uperfamily

Msn2/4 – do inglês *m*ulticopy *s*upressor of *S*NF1 *m*utation

Mix – do inglês *m*ixture

n.d – *n*ão *d*escrito

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – radical anião superóxido

OMS – organização mundial de saúde

Pdr – do inglês *p*leiotropic *d*rug *r*esistance

SC – do inglês *s*ynthetic *c*omplete

SGA – do inglês *s*ynthetic *g*ene *a*rray

TA – temperatura ambiente (20°C a 25°C)

UV – ultravioleta

UFC – unidade formadora de colónias

Yap1 – do inglês *yeast AP-1*

Ycf1 – do inglês *yeast cadmium factor*

YNB – do inglês *yeast nitrogen base*

### **Glossário**

*FLR1* – gene de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica um transportador membranar (Flr1) pertencente à família MSF, envolvido na destoxificação de múltiplas drogas, regulado pelo activador transcricional Yap1 na presença de benomil.

*GSH1* – gene de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica a enzima  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetase, envolvida na biossíntese de glutatona, regulado pelo activador transcricional Yap1 na presença de compostos pró-oxidantes.

*MSN2* – gene de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica o activador transcricional *zinc-finger* Msn2, envolvido na resposta geral a várias condições de stresse, nomeadamente stresse oxidativo.

*PDR3* – gene de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica o activador transcricional *zinc-finger* Pdr3, envolvido na resistência pleiotrópica a drogas. Regula a expressão de transportadores do tipo ABC nomeadamente do Pdr5.

*PDR5* – gene de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica um transportador membranar (Pdr5), envolvido na resistência pleiotrópica a drogas. É regulado positivamente pelos factores de transcrição Pdr1 e Pdr3.

Xenobiótico – composto químico estranho a um organismo ou sistema biológico.

*YAP1* – gene de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica o activador transcricional bZIP Yap1, envolvido na resposta antioxidante.

*YCF1* – gene de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica um transportador vacuolar (Ycf1) do tipo ABC, envolvido na destoxificação de metais e compostos conjugados a glutatona, regulado pelo activador transcricional Yap1 na presença de cádmio.

## RESUMO

A coumarina, umbeliferona (7-hidroxicoumarina) e o lapachol são metabolitos secundários produzidos por várias espécies de plantas amplamente utilizadas na medicina tradicional. Os relatos de inúmeras propriedades bioactivas, nomeadamente antimicrobiana, têm motivado um crescente interesse na investigação dos seus mecanismos de acção, metabolismo e toxicidade, tendo em vista o desenvolvimento e introdução de novos medicamentos na chamada medicina convencional.

Embora os seus mecanismos de acção não estejam claramente definidos, existem estudos que apontam para que algumas das suas características bioactivas possam estar relacionadas com propriedades antioxidantes/pró-oxidantes.

Utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo, neste trabalho procurámos avaliar o potencial antifúngico destes compostos e simultaneamente as suas propriedades antioxidantes/pró-oxidantes. Para tal, testámos os seus efeitos em estirpes deletadas para genes que codificam factores de transcrição envolvidos na resposta a stresse oxidativo (*YAP1* e *MSN2*), ou deletadas para genes que codificam transportadores (*PDR5*, *YCF1*, *FLR1*) ou factores de transcrição (*PDR3*), envolvidos na destoxificação de xenobióticos. Os nossos resultados demonstraram que a coumarina e o lapachol têm um efeito inibitório do crescimento celular, sendo as estirpes mais sensíveis a *yap1Δ* (coumarina e lapachol) e *ycf1Δ* (coumarina), apontando para uma possível actividade pró-oxidante destes compostos. A umbeliferona promoveu um efeito que pode ser estimulatório do crescimento, na fase de metabolismo respiratório, nas estirpes *yap1Δ* e *flr1Δ* sugerindo actividade antioxidante para este composto.

**Palavras-chave:** Coumarina; umbeliferona; lapachol; stresse oxidativo; antifúngico.



## ABSTRACT

The coumarin, umbelliferone (7-hidroxicoumarin) and the lapachol are secondary metabolites produced by several species of plants widely used in traditional medicine. Reports of numerous bioactive properties, including antimicrobial, have motivated an increasing interest in the investigation of its mechanisms of action, metabolism and toxicity, aimed at the development and introduction of new drugs on the so-called conventional medicine.

Although their mechanisms of action are not properly defined, there are studies that pointing out that some of the bioactive characteristics may be related to antioxidant/pro-oxidant properties.

Using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism, in this work we have evaluate the antifungal potential of these compounds and their antioxidant/pro-oxidant properties. To this end, we tested its effects in strains deleted for genes that encode transcription factors involved in the response to oxidative stress (*YAP1* and *MSN2*), or deleted for genes encoding transporters (*PDR5*, *YCF1*, *FLR1*) or transcription factors (*PDR3*) involved in detoxification of xenobiotics. Our results showed an inhibitory effect of cell growth by coumarin and lapachol, pointing to a possible pro-oxidant activity of these compounds; *yap1Δ* (coumarine and lapachol) and *ycf1Δ* (coumarine) strains were found to be the most sensitive. The umbelliferone triggered an effect that can be stimulatory of growth, during respiratory metabolism in *yap1Δ* and *flr1Δ* strains, suggesting an antioxidant activity for this compound.

**Keywords:** Coumarin; umbelliferone; lapachol; oxidative stress; antifungal.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	
1.1 Compostos naturais	1
1.1.2 Coumarinas	2
1.1.3 Lapachol	3
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo	5
1.3. Objectivo	8
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 Material biológico e meios de cultura	9
2.2 Avaliação da sensibilidade aos compostos e viabilidade celular	10
2.2.1 Determinação de curva de crescimento e ensaio de sobrevivência	10
2.2.2 Determinação de sensibilidade através de plaqueamento em <i>spots</i>	11
2.3 Avaliação da localização intracelular de Yap1-GFP e Msn2-GFP através de microscopia de fluorescência	11
3. RESULTADOS	
3.1 Coumarina e umbeliferona	13
3.1.1 O tipo de metabolismo celular influencia o padrão de sensibilidade à umbeliferona mas não à coumarina	13
3.1.2 A exposição à coumarina e umbeliferona não induz acumulação nuclear dos factores de transcrição Yap1 e Msn2	17
3.2 Lapachol	19
3.2.1 O mutante <i>yap1Δ</i> exhibe hipersensibilidade ao lapachol	19
3.2.2 A exposição ao lapachol induz acumulação nuclear dos factores de transcrição Yap1 e Msn2	22
4. DISCUSSÃO	
4.1 Potencial pró-oxidante da coumarina	24
4.2 Potencial antioxidante da umbeliferona	26
4.3 Potencial pró-oxidante do lapachol	28
4.4 Conclusão	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
6. ANEXOS	
6.1 Composição do meio de cultura e soluções	37
6.2 Ensaio preliminares	38

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Compostos naturais

Desde os primórdios da civilização que o homem procura na natureza, em particular nas plantas, a resposta para o alívio e tratamento de inúmeras doenças. Estudos paleontológicos, efectuados na caverna de Shanidar na cordilheira de Zagros, sugerem que já há mais de 60000 anos, o Homem de Neandertal poderá ter utilizado as propriedades curativas das plantas para fins medicinais (Solecki RS, 1975 citado em Ji *et al.*, 2009). O reconhecimento destas propriedades, resultou na utilização de um elevado número de plantas medicinais para o tratamento de doenças. Por exemplo nos anos 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimava que cerca de 65-80% da população de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, dependia de plantas medicinais como única fonte de acesso aos cuidados de saúde (Akerlele, O. citado em Júnior e Pinto, 2005; Dunn *et al.*, 1997).

Nos países industrializados os grandes investimentos feitos na investigação e o desenvolvimento de novos medicamentos sintéticos levaram, em meados do século XX, ao declínio do recurso à medicina tradicional (OMS, 2005). Nas últimas décadas, no entanto, tem vindo a verificar-se um crescente interesse pelos compostos de origem natural, não só pela consciencialização da população acerca dos problemas decorrentes do sobre consumo dos medicamentos convencionais (Cowan, 1999), mas também, devido ao reconhecimento por parte da comunidade científica, das suas propriedades bioactivas e do enorme potencial que estes representam na procura e desenvolvimento de novos medicamentos (Ji *et al.*, 2009).

#### Metabolitos secundários

Por definição, um produto natural é todo o composto produzido por um organismo vivo (Hanson, 2003; Ji *et al.*, 2009) e que decorre da sua necessidade em transformar um vasto número de compostos orgânicos, de modo a assegurar a sua sobrevivência, crescimento e reprodução (Dewick, 2009). Estes compostos podem ser divididos em três categorias: 1) metabolitos primários, que existem em todas as células desempenhando um papel crucial no seu metabolismo e reprodução; 2) polímeros de elevada massa molecular, envolvidos na estrutura celular; 3) metabolitos secundários, produzidos apenas em determinadas circunstâncias e que possuem uma distribuição muito mais limitada na natureza (Hanson, 2003; Dewick, 2009). Os metabolitos secundários têm um papel importante, não só ao nível da defesa contra predadores e stresses abióticos (e.g. exposição a radiação UV), mas também na atracção de organismos benéficos (e.g. polinizadores ou microrganismos simbiotes) (Cowan, 1999; Mazid *et al.*, 2011).

As coumarinas e o lapachol são exemplos de metabolitos secundários, produzidos por várias espécies de plantas utilizadas na medicina tradicional, alvo de um crescente interesse por parte da comunidade científica devido às suas inúmeras propriedades bioativas (Cowan, 1999; Moura *et al.*, 2001; Navarro-García *et al.*, 2011; Portillo *et al.*, 2001).

### 1.1.2 Coumarinas

Do ponto de vista químico, a coumarina (1,2-benzopirona) é o composto mais simples de uma grande família de compostos fenólicos (coumarinas), de origem natural ou sintética (Riveiro *et al.*, 2010). Apresenta-se na forma de um cristal branco e a sua estrutura (Figura 1.1) é constituída por um anel benzénico fundido a uma  $\alpha$ -pirona (Cowan, 1999). O seu nome deriva de “cumarú” que é a designação comum de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd., também conhecida por “fava-tonca”, da qual foi extraída pela primeira vez em 1820 (Bruneton, 1999). Até 1996 foram identificados cerca de 1300 compostos deste grupo (Hoult e Payá, 1996).



**Figura 1.1** Estrutura química: a. coumarina; b. umbeliferona

### Ocorrência, síntese e metabolismo

Podem encontrar-se, não só em várias plantas e óleos essenciais (*e.g.* “fava-tonca”, trevo doce, óleo de cassia e lavanda, chá verde, mirtilos e amoras silvestres), mas também em fungos e bactérias (*e.g.* *Aspergillus* e *Streptomyces*) (Hoult e Payá, 1996; Lacy e O’Kennedy, 2004).

A biossíntese das coumarinas ocorre via hidroxilação, glicosilação e ciclização do ácido cinâmico (Aslam *et al.*, 2010), podendo ser também obtidas sinteticamente através de vários métodos, tais como, reacção de Pechmann, Perkin, Reformatsky e Knoevenagel (Dighe *et al.*, 2010). A umbeliferona (7-hidroxicoumarina) é uma coumarina simples que possui um grupo -OH na posição 7 (Figura 1.1), tem uma ampla distribuição em plantas de uso doméstico, particularmente da família das Apiaceae (Umbelíferas), como por exemplo, cenouras, coentros e angélica (Vasconcelos *et al.*, 2009). A coumarina e a umbeliferona, apresentam fraca solubilidade em água (0,22 e 0,031% respectivamente), no entanto, possuem elevados coeficientes de partição, o que no seu conjunto, sugere que possam atravessar bicamadas lipídicas através de difusão passiva (Cooke, 1998; Palonciová *et al.*, 2013).

A coumarina é amplamente utilizada como aditivo em alimentos, cosméticos, fármacos, corantes fluorescentes e insecticidas (Aslam *et al.*, 2010), estando classificada pelo Conselho da Europa, como sendo “um princípio activo” e, as concentrações máximas permitidas em géneros alimentícios, definidas no anexo II da Diretiva Europeia (88/388/EEC).

No homem, a umbeliferona é o principal metabolito não tóxico da coumarina (Lacy e O’Kennedy, 2004). Estudos realizados em humanos revelaram que 68-92% da dose de coumarina ingerida, é excretada via urina sob a forma de 7-hidroxycoumarina, no entanto, embora esta seja a sua principal via de destoxificação, alguns indivíduos podem metabolizar uma porção considerável através de outra via, levando à formação de alguns intermediários tóxicos, como por exemplo o 3,4-epóxido (Lacy e O’Kennedy, 2004; Lake, 1999).

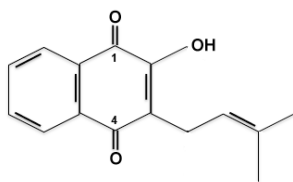
Inúmeros estudos efectuados *in vivo*, têm revelado a existência de consideráveis diferenças nas vias metabólicas da coumarina entre as várias espécies, pelo que, a determinação do seu destino metabólico, nomeadamente intermediários produzidos, é bastante importante para a avaliação dos seus mecanismos de acção e toxicidade específica em cada organismo (Lacy e O’Kennedy, 2004; Lake, 1999; Riveiro *et al.*, 2010).

#### Característica bioactivas

As coumarinas apresentam um vasto leque de características bioactivas de tal modo interessantes, que se transformaram num atractivo alvo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Lacy e O’Kennedy, 2004). A sua fama advém particularmente das características antitrombótica (e.g. varfarina), anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana (Payá *et al.*, 1992; Baglin, 1998; Houlst e Payá, 1996; Lopez-Gonzalez *et al.*, 2004; Widelski *et al.*, 2009). Alguns estudos apontam, ainda, para atividade antiviral e antioxidante (Payá *et al.*, 1992; Mazzei *et al.*, 2008; Ramesh e Pugalendi, 2006; Ramesh e Pugalendi, 2007; Singh *et al.*, 2010), no entanto, está descrito que em determinadas circunstâncias, algumas coumarinas podem actuar também como compostos pró-oxidantes (Payá *et al.*, 1992).

#### **1.1.3 Lapachol**

O lapachol é um composto orgânico natural, isolado pela primeira vez da madeira da árvore *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb (Bignoniaceae), também conhecida por “lapacho”, “pau d’arco” ou “ipê roxo”, em 1882 por E. Paternò (Fonseca *et al.*, 2003). Quimicamente é uma hidroxi-naftoquinona (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona) cuja estrutura está representada na Figura 1.2.



**Figura 1.2** Estrutura química do lapachol.

### Ocorrência, síntese e metabolismo

As naftoquinonas pertencem a um importante grupo de compostos naturais formados a partir da oxidação de fenóis, as quinonas, e caracterizam-se por serem compostos derivados do anel naftaleno, no qual apresentam 2 grupos carbonilos nas posições 1,2 (*orto*-naftoquinonas) ou nas posições 1,4 (*para*-naftoquinonas) (Silva *et al.*, 2003).

Estes compostos encontram-se amplamente distribuídos na natureza, participando em diversos processos biológicos. O lapachol foi isolado em diversas espécies vegetais, nomeadamente das famílias Bignoniaceae, Verbenaceae, Leguminosae, Sapotaceae, Scrophulariaceae, Malvaceae, e Proteaceae, sendo particularmente abundante em espécies do género *Tabebuia*, de onde pode ser facilmente extraído, através de métodos baseados na sua solubilidade em solventes orgânicos (Almeida, 2009; Ferreira, 1996; Fonseca *et al.*, 2003; Castellanos *et al.*, 2009). Em 1927, Fieser desenvolveu pela primeira vez um método para a sua obtenção sintética e, desde então, têm sido propostos inúmeros métodos (*e.g.* Hooker, 1936; Pettit e Houghton, 1971 e Kazantzi, 2007 citados em Hussain *et al.*, 2007), no entanto, todos apresentam um valor prático reduzido, tendo em conta a abundância e facilidade de extracção do composto natural (Fonseca *et al.*, 2003).

Este composto apresenta-se sob a forma de um pó amarelo, altamente lipofílico, com fraca solubilidade em água, mas bastante solúvel em soluções alcalinas. A solubilidade em água é fortemente influenciada pelo pH, demonstrando um comportamento típico de uma substância ionizável fracamente ácida (Ferreira, 1996; Fonseca *et al.*, 2003; Lira *et al.*, 2008).

Apesar do extensivo uso do lapachol na medicina tradicional, existem poucas referências acerca do seu metabolismo em humanos e outros animais (Niehues *et al.*, 2012) e, estudos efectuados em diversos microrganismos, revelaram a existência de biotransformação do lapachol através de oxidação, levando à obtenção de diferentes metabolitos bioactivos (Otten e Rosazza, 1978, 1979).

### Característica bioactivas

Desde que em 1956 foi descrita pela primeira vez actividade antibacteriana para o lapachol e, posteriormente em 1968, actividade antineoplásica (Almeida *et al.*, 1990; Rao *et al.*, 1968), que este composto tem sido alvo de um crescente interesse na procura propriedades bioactivas (Hussain *et al.*, 2007), tendo sido já reportadas várias, entre as quais actividade anti-inflamatória, antiviral, antiprotzoária e antifúngica (Almeida *et al.*, 1990; Sacau *et al.*, 2003; Salas *et al.*, 2011; Guiraud *et al.*, 1994). Apesar deste largo espectro de actividades biológicas, o (s) seu (s) mecanismo (s) de acção não está ainda claramente definido (Moura *et al.*, 2001), no entanto, uma das suas características mais interessantes parece ser a capacidade de induzir stress oxidativo, através da formação intracelular de espécies reactivas de oxigénio (ERO) (Kumagai e Shimojo, 2002).

De uma perspectiva toxicológica, têm sido propostos dois grandes mecanismos para a acção citotóxica das quinonas em geral. Primeiro, podem actuar como compostos electrófilos, via reacção de Michael, levando a modificações covalentes de moléculas biológicas (e.g. proteínas e ADN) com consequente compromisso das suas funções celulares. Em segundo, as quinonas são moléculas com alto potencial redox, podendo entrar num ciclo com o seu radical semiquinona (ciclo redox), levando, em condições aeróbias, à formação de ERO, tais como radical anião superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) (Bolton *et al.*, 2000; Kumagai e Shimojo, 2002; Rodriguez *et al.*, 2004). O grau de contribuição destes dois mecanismos, para a toxicidade geral das quinonas, não é suficientemente claro e deverá ser altamente dependente da reactividade específica do composto, do tipo de organismo e das condições de exposição celular (Henry e Wallace, 1996; Bolton *et al.*, 2000; Kumagai e Shimojo, 2002; Rodriguez *et al.*, 2004; ). Por outro lado, assumir que estes são os únicos mecanismos intervenientes na sua toxicidade, pode mascarar a existência de outros alternativos (Rodriguez *et al.*, 2004).

### **1.2 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo**

Os compostos antifúngicos exercem a sua actividade através de variados mecanismos, alguns dos quais ainda desconhecidos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) é um organismo unicelular eucariótico, amplamente reconhecido como sendo um excelente instrumento biológico para identificar compostos antifúngicos, identificar alvos e estudar os seus mecanismos de acção, já que muitos dos seus genes são ortólogos de genes de fungos patogénicos, verificando-se também uma elevada conservação dos mecanismos metabólicos e reguladores (Agarwal *et al.*, 2003; Bharucha e Kumar, 2007; Qaddouri *et al.*, 2011).

Das inúmeras características que fazem deste organismo um excelente modelo de estudo destacam-se: 1) o facto de sobreviver sob variadas condições e meios de cultura, permitindo ao investigador um controlo dos parâmetros ambientais; 2) apresentar um crescimento rápido, com tempos de geração entre os 90 e os 140 minutos, o que permite uma fácil manipulação a custos reduzidos; 3) possuir um genoma totalmente sequenciado e bem caracterizado, bem como mecanismos de recombinação homóloga, o que possibilita a introdução de modificações genéticas tais como mutações/deleções e marcadores, de forma a monitorizar alterações na expressão genética em resposta a várias condições experimentais; e 4) a existência de perfis de interacção genética para 75% dos seus genes, obtidos através da rede de análise *synthetic gene array* (SGA) (Agarwal *et al.*, 2003; Botstein e Fink, 2011; Hohmann e Mager, 2003; Rodriguez *et al.*, 2004; Sherman *et al.*, 2003; Constanzo *et al.*, 2010).

#### Indução de stresse e mecanismos de defesa celular

A interacção de um organismo com o meio ambiente é essencial para a sua sobrevivência e, para conseguir manter as condições óptimas no meio intracelular, as células desenvolveram programas específicos de expressão genética, nos quais grupos de genes são activados enquanto outros se mantêm inactivos (Parveen *et al.*, 2004). Condições ambientais que ameacem a sobrevivência das células ou, pelo menos, as impeçam de desenvolver de uma forma óptima, é comumente referido como stresse celular (Hohmann e Mager, 2003). As alterações ambientais passíveis de induzir stresse podem ser de natureza física ou química, e.g. temperatura, pressão, disponibilidade de nutrientes, agentes químicos tóxicos (xenobióticos) (Hohmann e Mager, 2003).

O sucesso das terapias antifúngicas está dependente da capacidade que as células apresentam para se adaptar e resistir à sua exposição, *i.e.*, está dependente dos seus mecanismos de resistência a esses compostos. Estes mecanismos envolvem a diminuição do influxo da droga e/ou aumento do seu efluxo através da alteração de produção ou especificidade dos transportadores, destoxificação ou sequestro de compostos activos e sobre produção ou modificação estrutural de proteínas alvo (Morschhäuser, 2010; Sanglard, 2002; Shapiro *et al.*, 2011).

Não obstante a variedade de compostos com acção antifúngica, os alvos são na sua grande maioria direccionados, directa ou indirectamente, para a parede e membranas e particularmente para o principal esterol da membrana fúngica, o ergosterol (Odds *et al.*, 2003). No entanto, está descrito que alguns compostos, e.g. 7-chlorotetrazol[5,1-c]benzo[1,2,4]triazine e o eugenol, podem exercer o seu potencial antifúngico através da indução de stresse oxidativo (Batova *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2011).



O stresse oxidativo é usualmente considerado como sendo o resultado do desequilíbrio verificado entre a produção, ou influxo, de ERO ou compostos pró-oxidantes, e a capacidade que a célula tem de os neutralizar, com vantagem para o primeiro (Toledano *et al.*, 2003; Halliwell, 2001). As ERO são agentes tóxicos que podem danificar uma grande variedade de componentes celulares. Podem ser produzidos durante o normal processo do metabolismo respiratório, ou através da exposição a compostos pró-oxidantes. A resposta antioxidante de *S. cerevisiae* é feita através de diversos mecanismos que incluem sistemas de destoxificação de ERO, diminuição da sua produção e reparação dos danos por eles causados e, embora muitos destes mecanismos sejam específicos para stresse oxidativo, existem outros que são gerais e que tipicamente respondem a vários tipos de stresse (Morano *et al.*, 2011).

Desta forma, a compreensão dos mecanismos moleculares através dos quais as células detectam e respondem perante situações de stresse, são essenciais para avaliar a toxicidade de compostos com acção antifúngica e delinear estratégias para minimizar situações de resistências (Teixeira, 2011).

#### Utilização de estirpes mutantes

Uma das grandes vantagens da utilização de *S. cerevisiae* para testar xenobióticos, é a possibilidade de se poderem utilizar colecções de estirpes mutantes que permitem identificar diferentes padrões de sensibilidade, contribuindo desta forma, não só para uma melhor clarificação dos seus mecanismos de acção, mas também dos mecanismos de resistência que as células apresentam. A utilização de estirpes haplóides mutantes, tem como princípio o facto de a perda de função de um determinado gene, interveniente numa via afectada por um composto, poder levar a um efeito letal após a exposição a esse composto em concentrações que normalmente seriam apenas subletais, *i.e.*, a deleção pode levar a uma hipersensibilidade, sinalizando o gene deletado como tendo um papel importante no mecanismo de defesa das células à acção tóxica desse composto (Bharucha e Kumar, 2007; Lopez *et al.*, 2008).

### 1.3 Objectivo

Actualmente, está a ser avaliada a utilização destes compostos de origem natural na medicina convencional, no entanto, os mecanismos de acção através dos quais exercem os seus efeitos a nível celular, não estão ainda completamente estabelecidos, pelo que estudos que contribuam para esse conhecimento assumem uma grande importância (Duncan et al., 1998; Hodek et al., 2009; Lake, 1999; Silva et al., 2003). Desta forma, com este trabalho pretendeu-se em *S. cerevisiae*:

- avaliar o potencial antifúngico dos xenobióticos coumarina, umbeliferona e lapachol;
- identificar possíveis mecanismos de acção destes xenobióticos, nomeadamente ao nível do seu impacto na resposta antioxidante.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Nota prévia: Foi utilizado equipamento comum para laboratório de Microbiologia destacando-se:

- Espectrofotômetro – Helios β, Spectronic Unicam.
- Incubadores – Heraeus BK 600; Minitron, Infost HT.

### 2.1 Material biológico e meios de cultura

As estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho encontram-se descritas na Tabela 2.1. Salvo indicação em contrário, as culturas foram incubadas entre 28° e 30°C em meio sintético completo (SC) com glucose a 2% (anexo I) sólido ou líquido. Todas as culturas em meio líquido foram sujeitas a incubação com agitação orbital. A referência à densidade celular em meio líquido foi efectuada com base na densidade óptica a 600nm ( $DO_{600nm}$ ) na seguinte proporção:  $1DO_{600nm}=3 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 2.1** – Estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho.

Estirpe	Genótipo relevante	Origem
BY4741	<i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf
BY4742	<i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf
<i>yap1Δ</i>	<i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; yap1Δ</i> ; isogénica a BY4741	Y.S.
YAP1-GFP	<i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; YAP1-GFP	Y.S.
MSN2-GFP	<i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; MSN2-GFP	Y.S.
<i>msn2Δ</i>	<i>his3Δ1, leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> ; YMR037c::KanMX4; isogénica a BY4742	Euroscarf
<i>pdr5Δ</i>	<i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> ; YOR153w::KanMX4; isogénica a BY4742	Euroscarf
<i>pdr3Δ</i>	<i>his3Δ; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> ; YBL005w::KanMX4; isogénica a BY4742	Euroscarf
<i>flr1Δ</i>	<i>his3Δ1, leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> ; YBR008c::kanMX4; isogénica a BY4742	Euroscarf
<i>ycf1Δ</i>	<i>his3Δ1, leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> ; YDR135c::kanMX4; isogénica a BY4742	Euroscarf

Y.S. – Yeast Stress Lab.

Dadas as características químicas dos compostos em estudo, nomeadamente a sua fraca solubilidade em soluções aquosas, foram necessários vários ensaios preliminares, tendo em consideração a informação bibliográfica disponível, que permitiram seleccionar o solvente mais compatível para os meios de cultura utilizados (Hazardous Substances Data Bank; Qasheesh *et al.*, n.d; Aslam *et al.*, 2010; Navarro-García *et al.*, 2011; Ojala *et al.*, 2000).

## 2.2 Avaliação da sensibilidade aos compostos e viabilidade celular

### 2.2.1 Determinação de curva de crescimento e ensaio de sobrevivência

Para determinar o efeito dos compostos químicos em estudo no crescimento das estirpes de *S. cerevisiae*, foram inoculadas pré-culturas em meio SC líquido, na ausência dos compostos, e incubadas durante aproximadamente 18h, atingindo uma  $DO_{600nm}$  entre os 3 e os 5 (fase de saturação). Partindo das pré-culturas, foram iniciadas culturas em meio líquido SC com  $DO_{600nm}$  de 0,2.

Foram utilizadas duas abordagens diferentes para os tratamentos com os compostos em estudo: 1) foram adicionados no início da cultura, isto é, o meio SC foi suplementado com cada um dos compostos em separado e a proliferação celular monitorizada através da leitura da  $DO_{600nm}$  após 4h, 6h, 8h, 10h e 24h de tratamento; 2) foram adicionados a culturas em fase inicial de crescimento exponencial ( $DO_{600nm}$  0,5-0,7) e a proliferação celular monitorizada através leitura da  $DO_{600nm}$  após 2h, 4h, 6h e 24h de tratamento. Para cada uma das abordagens foram incluídas culturas controlo (apenas com o solvente).

A taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) foi determinada através da equação (1) que corresponde à equação da recta  $y = b + aX$ , com  $y = \ln N_t$ ;  $X = (t - t_0)$ ;  $a = \mu$  (declive)  $b = \ln N_0$  (ordenada na origem):

$$\ln N_t = \ln N_0 + \mu (t - t_0) \quad (1)$$

simplificando origina a equação (2), onde  $N_0$  = DO no tempo 1;  $N_t$  = DO no tempo 2;  $t$  = tempo 2 ;  $t_0$ = tempo 1:

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0)/(t-t_0) \quad (2)$$

O tempo de geração ( $T_g$ ) é inversamente proporcional à taxa específica de crescimento através da expressão (Ramanathan e Schreiber, 2007):

$$T_g = \ln(2)/\mu \quad (3)$$

O efeito dos compostos coumarina (Sigma<sup>®</sup>) e umbeliferona (Sigma<sup>®</sup>) na viabilidade celular, foi avaliado através de ensaios de sobrevivência em duas fases distintas do metabolismo celular em *batch*: fase fermentativa (avaliada durante a fase exponencial) e fase de metabolismo respiratório (avaliada após o *diauxic shift*). Para tal, foram iniciadas culturas na presença de cada um dos compostos (conforme abordagem 1 descrita anteriormente) e, retiradas alíquotas no tempo 0 (início da cultura), após 6h de tratamento (fase exponencial com  $DO_{600nm}$  0,6-1) e após 24h de tratamento (pós *diauxic shift*), das quais, após diluições decimais sucessivas em solução de desagregação (pH8) (anexo I), foram retirados 50 $\mu$ L e plaqueados em meio SC sólido. Este processo foi efectuado através de espalhamento e utilizando esferas de vidro de 3mm de diâmetro previamente

esterilizadas. Após 3 dias de incubação a 28°-30°C, foram contadas todas as colónias, assumindo-se que cada colónia teve como origem uma única célula (unidade formadora de colónias - ufc). As placas de SC foram preparadas no máximo com 48h de antecedência.

### **2.2.2 Determinação de sensibilidade através de plaqueamento em spots**

Para determinar fenótipos de sensibilidade das estirpes de *S. cerevisiae* ao lapachol, foram preparadas pré-culturas (obtidas nas mesmas condições descritas no ponto 2.2.1) das quais foram recolhidas células por centrifugação (13000 rpm à TA) e ressuspensas em solução de desagregação. A DO<sub>600nm</sub> da suspensão celular foi ajustada para 3 e, a partir desta, foram feitas 5 diluições decimais sucessivas. Aplicaram-se 3µL de cada uma das diluições na superfície de meio SC sólido e SC suplementado com lapachol (Sigma®). As placas com meio SC foram preparadas sempre no dia da sua utilização e o lapachol incorporado no meio quando este se encontrava entre os 45°C e os 55°C. Todas as placas foram incubadas a 28°C-30°C durante 2 dias.

### **2.3 Avaliação da localização intracelular de Yap1-GFP e Msn2-GFP através de microscopia de fluorescência**

Para avaliar a localização intracelular das proteínas quiméricas Yap1-GFP e Msn2-GFP após exposição aos compostos em estudo, preparam-se pré-culturas (conforme descrito na página anterior) a partir das quais se iniciaram culturas com DO<sub>600nm</sub> 0,2 em meio líquido SC, suplementado com cada um dos compostos em separado (coumarina e umbeliferona) e uma cultura controlo (apenas com o solvente). Após 4h de incubação (DO<sub>600nm</sub> 0,5-0,7), as culturas foram subdivididas em dois grupos tendo um dos grupos sido submetido a tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 e 60 minutos. Após cada período de incubação, as células foram fixadas com formaldeído.

Para o lapachol, as culturas foram, da mesma forma, iniciadas em meio SC mas sem a adição do composto. Após 4h de incubação, as culturas foram suplementadas com lapachol, ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (controlo positivo) e incubadas durante 10 e 60 minutos. Após os períodos de incubação procedeu-se à fixação das células com formaldeído.

Nota: As estirpes (Yap1-GFP e Msn2-GFP) foram previamente testadas para a sua capacidade de resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por forma a seleccionar tempos e concentrações para a sua utilização como controlo positivo e, estabelecimento de protocolo de fixação com formaldeído (Monteiro, J.P., 2006).

Fixação: As células foram fixadas na presença de 3,7% de formaldeído. Após incubação de 10 minutos a 30°C com agitação orbital, recolheram-se as células por centrifugação (13000 rpm a 20°C) e o sedimento foi ressuspensionado em PBS (pH7,2) (anexo I) com 3,7% de

formaldeído. Após 60 minutos de incubação a 30°C com agitação orbital, as células foram novamente recolhidas por centrifugação e o sedimento lavado 3 vezes com PBS. No final, foram ressuspensas em 15-20µL de PBS ao qual foi adicionado DAPI na concentração final de 0,5µg/mL.

As lâminas foram preparadas com 5µL de células fixadas + 5µL de meio de montagem Mowiol® 4-88 e seladas com lamela e verniz.

As células foram visualizadas num microscópio Leica DMRA2 (DIC – *Differential Interference Contrast microscopy*) equipado com câmara CCD e Deltavision core com câmara EM-CCD (*Electron-Multiplying CCD*). Todas as amostras foram observadas com objectiva de imersão 100x e a aquisição de imagens foi efectuada através do programa MetaMorph 4.6r5 e softWorx (*Applied Precision*). Utilizaram-se para o processamento das imagens os programas de edição Fiji/imageJ v1.47 e Adobe Photoshop CS5 v12.0.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Coumarina e umbeliferona

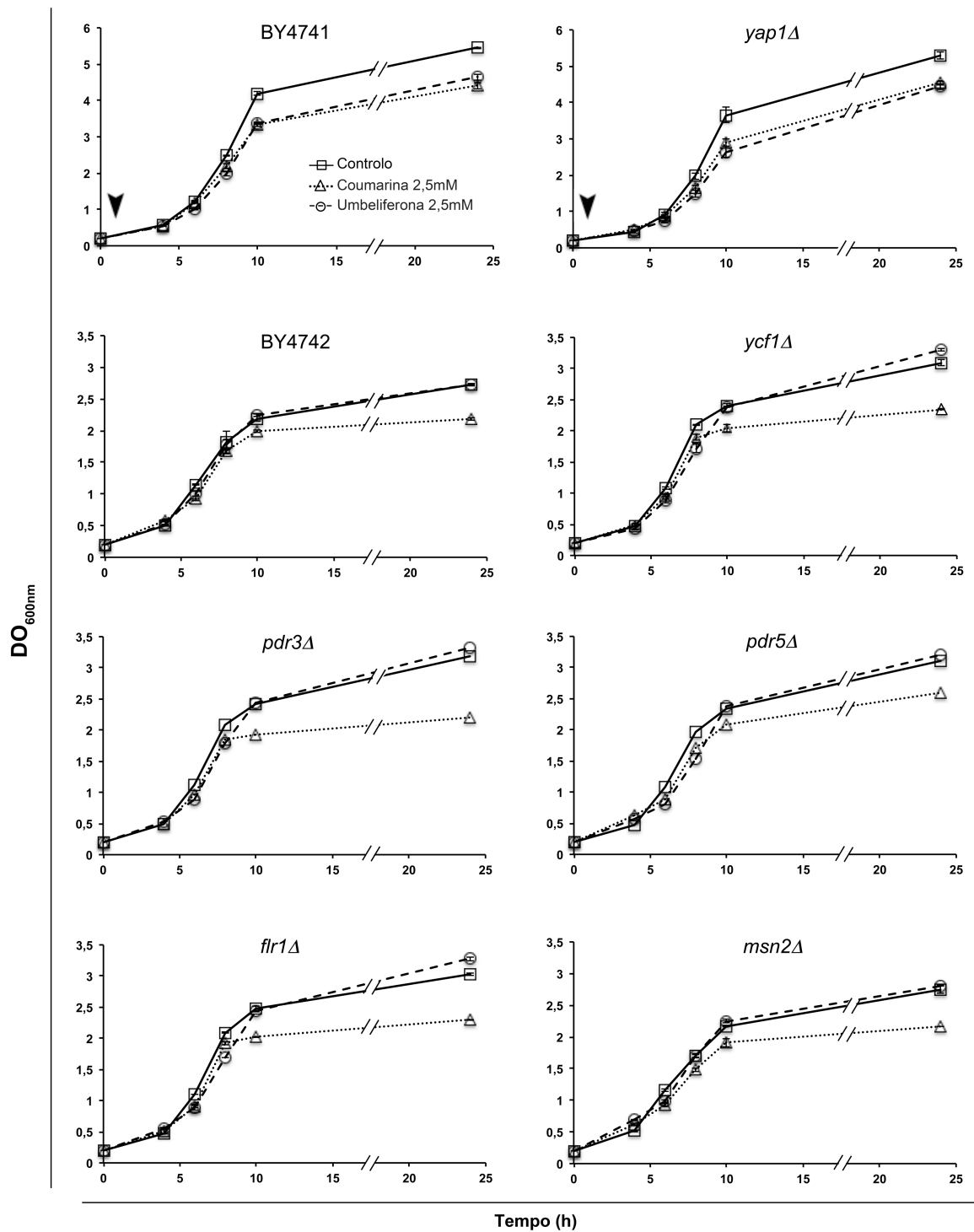
##### 3.1.1 O tipo de metabolismo celular influencia o padrão de sensibilidade à umbeliferona mas não à coumarina

Por forma a seleccionar o tipo de tratamento (adição dos compostos no início da cultura ou na fase de crescimento exponencial) e a concentração para ser usada nos ensaios de sobrevivência, foram efectuadas curvas de crescimento, utilizando três concentrações diferentes de ambos os compostos em ambas as abordagens. Foi seleccionada a abordagem com a adição dos compostos no início da cultura assim como a concentração máxima testada (2,5mM), uma vez que foi nestas condições que se verificaram as maiores diferenças relativamente ao controlo (anexo II).

A sensibilidade das várias estirpes foi testada através de curvas de crescimento e ensaios de sobrevivência onde, o impacto na viabilidade celular foi avaliado em duas fases distintas do metabolismo celular da cultura em *batch*. A taxa de sobrevivência foi definida como a proporção de células viáveis (unidades formadoras de colónias) em cada ponto em relação ao ponto zero do controlo, correspondendo esse valor a 1.

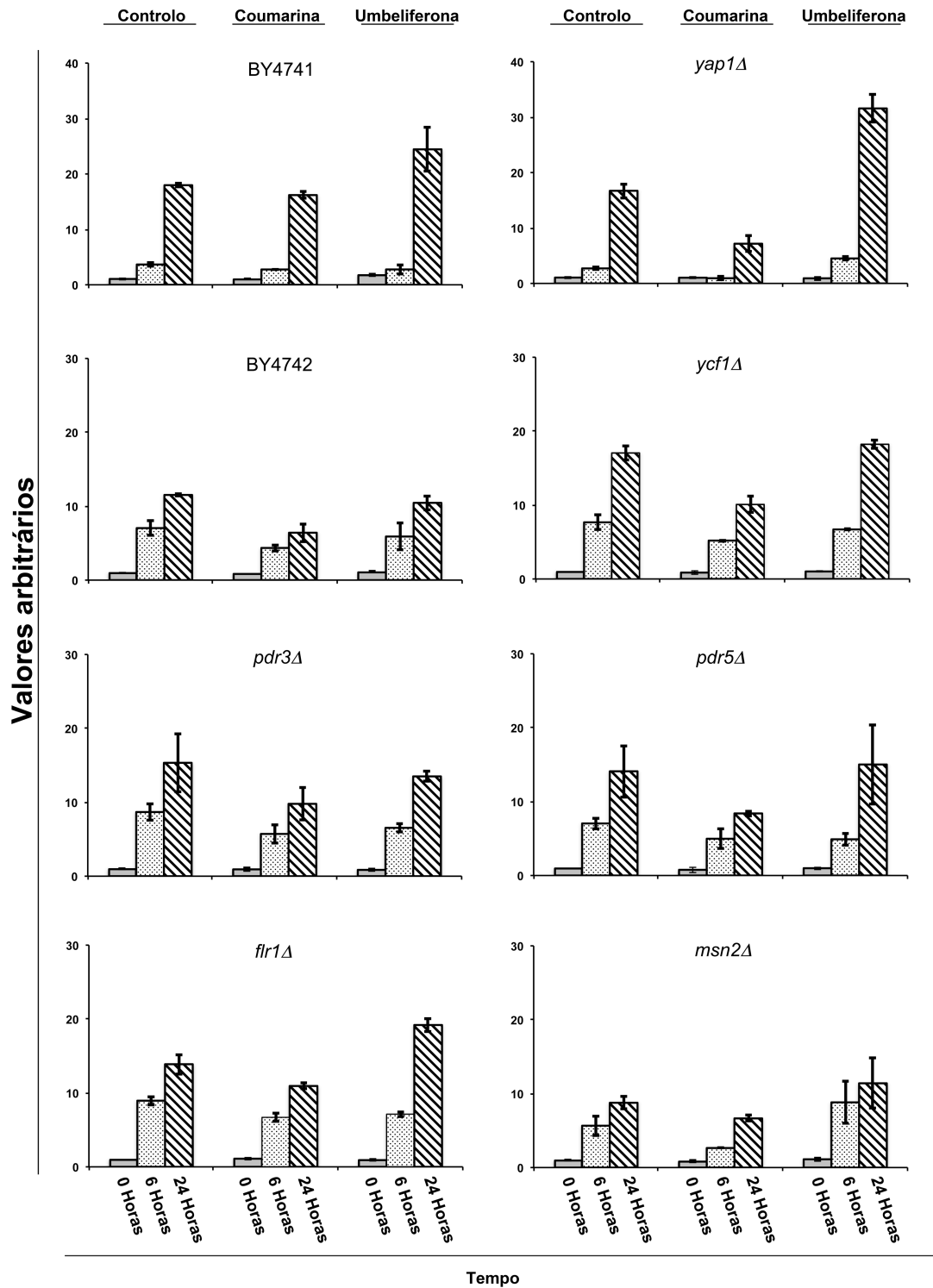
Está descrito que embora algumas coumarinas apresentem propriedades antioxidantes, em determinadas circunstâncias, podem funcionar como agentes pró-oxidantes (Payá *et al.*, 1992). Assim, com este estudo procuraram-se detectar diferenças de sensibilidade aos compostos, utilizando estirpes deletadas para genes que codificam factores de transcrição envolvidos na resposta a stresse oxidativo (*YAP1* e *MSN2*), ou deletadas para genes que codificam transportadores (*PDR5*, *YCF1*, *FLR1*) ou factores de transcrição (*PDR3*), envolvidos na destoxificação de xenobióticos. Estas últimas são muitas vezes utilizadas para testar compostos que, à semelhança destes, possuem características hidrofóbicas, ou para as quais existem limitações ao nível das concentrações a testar (Rogers *et al.*, 2001).

Após o tratamento com coumarina verificou-se, em todas as estirpes, um atraso no crescimento (Figura 3.1), que se manteve após 24h de tratamento e que foi acompanhado de uma diminuição na viabilidade celular em ambas as fases do metabolismo celular (Figura 3.2). As estirpes mais sensíveis foram a *yap1Δ*, para a qual se verificou uma diminuição de mais de 50% de viabilidade celular relativamente ao controlo (ausência de coumarina) e a *ycf1Δ*, onde se verificou também uma assinalável diminuição da viabilidade, mais acentuada na fase de metabolismo respiratório (Figura 3.2). Este resultado, sugere que a coumarina actue como um agente pró-oxidante já que está demonstrado que estirpes *yap1Δ* apresentam uma hipersensibilidade a compostos pró-oxidantes, tais como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diamida ou



**Figura 3.1** Curvas de crescimento das várias estirpes de *S. cerevisiae* na presença de coumarina e umbeliferona. Iniciaram-se culturas em meio SC suplementado com cada um dos compostos ou com controle solvente (a seta indica o momento da adição dos compostos- início), conforme descrito em material e métodos. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes  $\pm$  erro padrão.





**Figura 3.2** Taxa de sobrevivência das várias estirpes de *S. cerevisiae* após exposição à coumarina e umbeliferona. A viabilidade celular foi monitorizada às 0h (imediatamente após a adição dos compostos), 6h (correspondente à fase de metabolismo fermentativo) e 24h (correspondente à fase de metabolismo respiratório), conforme descrito em material e métodos. Os valores arbitrários representam a proporção de células viáveis (unidades formadoras de colônias) em cada ponto em relação ao ponto zero do controle. Os gráficos apresentados reflectem a média de dois ensaios independentes com três réplicas biológicas  $\pm$  erro padrão.

diatilmaleato (Coleman *et al.*, 1999; Kuge *et al.*, 1997). Por outro lado, estudos anteriores demonstraram que o transportador vacuolar Ycf1, pode estar envolvido não apenas na destoxificação de metais pesados (como o cádmio), mas também na tolerância a agentes pró-oxidantes, tais como diamida e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno que formam conjugados com a glutatona (GSH,  $\gamma$ -glutamyl-cisteinil-glicina), verificando-se também nesses casos, uma hipersensibilidade de estirpes *ycf1* $\Delta$  (Li *et al.*, 1996; Wemmie e Moye-Rowley, 1997).

Relativamente à umbeliferona, as estirpes estudadas apresentam diferentes padrões de sensibilidade (Figura 3.2). A viabilidade celular nas estirpes selvagem (BY4742) e *ycf1* $\Delta$  não foi significativamente afectada em nenhuma fase do metabolismo celular. Nas estirpes *pdr3* $\Delta$  e *pdr5* $\Delta$  verificou-se uma ligeira diminuição da viabilidade celular na fase fermentativa, no entanto, na fase de metabolismo respiratório o resultado não é claro devido à falta de reprodutibilidade obtida, tanto no controlo (*pdr3* $\Delta$ ), como no tratamento (*pdr5* $\Delta$ ). Nas estirpes *flr1* $\Delta$  verificou-se, na fase de metabolismo fermentativo, uma ligeira diminuição da taxa de sobrevivência mas que é totalmente anulada na fase de metabolismo respiratório, verificando-se mesmo um claro aumento face ao controlo. Nas estirpes *yap1* $\Delta$  e *msn2* $\Delta$ , verificou-se um aumento da viabilidade celular em ambas as fases do metabolismo que, no caso da estirpe *msn2* $\Delta$  não se pode valorizar devido à falta de reprodutibilidade dos resultados, mas que é evidente na estirpe *yap1* $\Delta$ , principalmente na fase de metabolismo respiratório. De facto, o maior aumento da taxa de sobrevivência na presença de umbeliferona, verificou-se na estirpe *yap1* $\Delta$  após 24h de tratamento. Uma vez que é nesta fase que se verifica a maior produção e acumulação de espécies reactivas de oxigénio (ERO) (Galdieri *et al.*, 2010), este resultado sugere-nos um possível efeito antioxidante por parte da umbeliferona. É expectável que em estirpes que possuam mecanismos de resposta antioxidante afectados, a presença de um composto com capacidade de neutralizar ERO seja particularmente vantajosa na fase em que há acumulação dessas espécies reactivas (Bahrim *et al.*, 2007).

As curvas de crescimento, após exposição à umbeliferona, (Figura 3.1) reflectem os resultados da sobrevivência (Figura 3.2), tendo-se verificado nenhum, ou ligeiro, atraso de crescimento na fase exponencial que depois é totalmente recuperado na fase de metabolismo respiratório. Excepção para as estirpes selvagem (BY4741) e *yap1* $\Delta$  (com isogenia diferente das restantes) onde, embora se tenha verificado um atraso no crescimento que se manteve em ambas as fases de metabolismo, este não se reflectiu na viabilidade celular, já que após 24h de tratamento ambas as estirpes apresentam uma taxa de sobrevivência mais elevada comparativamente ao controlo.

### 3.1.2 A exposição à coumarina e umbeliferona não induz acumulação nuclear dos factores de transcrição Yap1 e Msn2

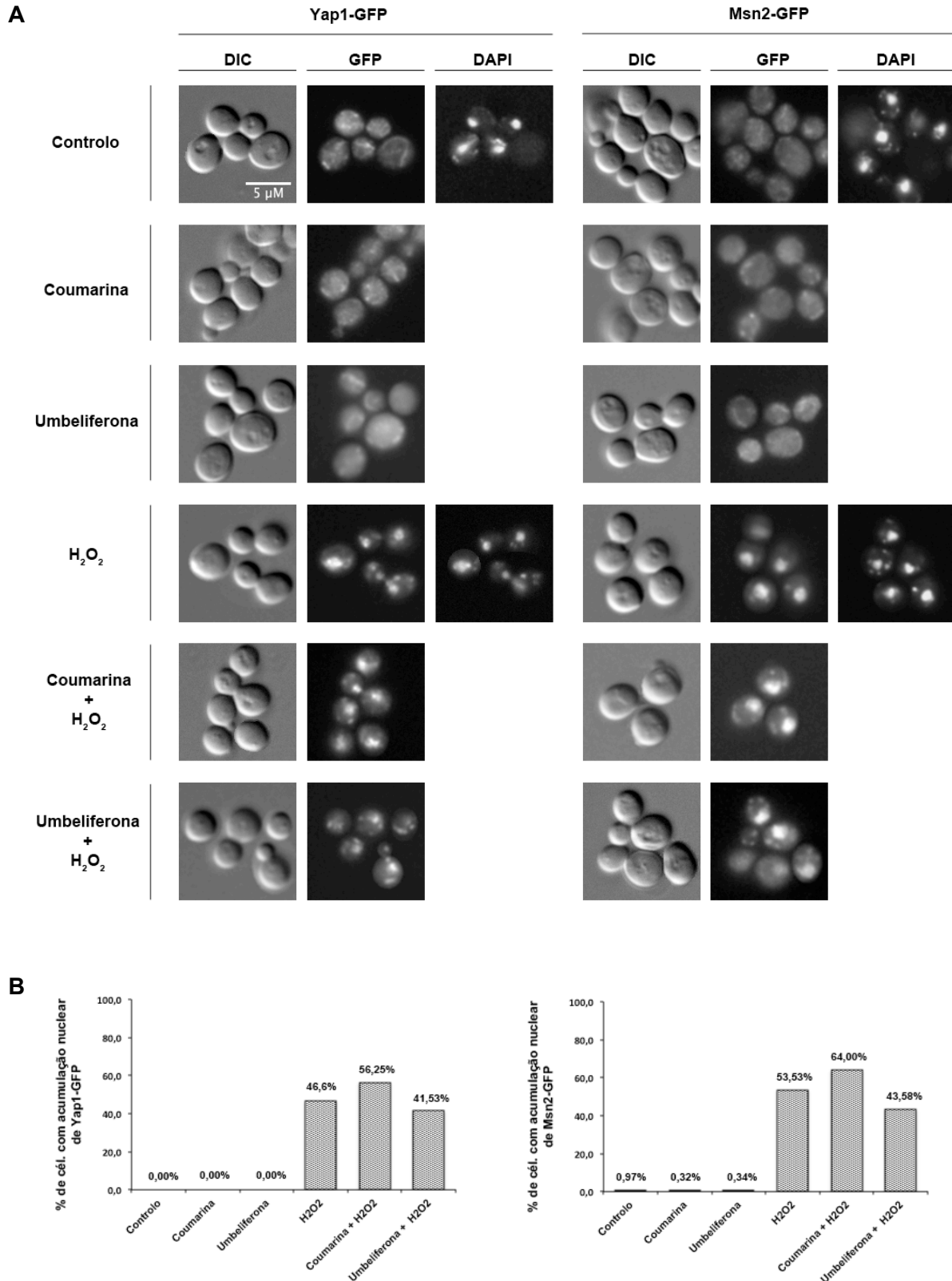
Está descrito que após exposição celular a stresse oxidativo, os factores de transcrição Yap1 e Msn2 se acumulam no núcleo, levando à activação de inúmeros genes-alvo cujos produtos estão envolvidos na resposta celular antioxidante (Boisnard *et al.*, 2009; Coleman *et al.*, 1999; Kuge *et al.*, 1997). Desta forma, a avaliação da localização intracelular destes factores de transcrição, após exposição à coumarina e umbeliferona, pode contribuir para um maior esclarecimento acerca do mecanismo de acção desses compostos no sistema biológico em estudo.

Ambos os compostos foram testados de forma individual, para avaliar o seu poder oxidante neste sistema, ou em conjugação com  $H_2O_2$ , que, funciona não só como controlo positivo da experiência, mas também como agente indutor de stresse oxidativo, permitindo a avaliação do potencial antioxidante dos compostos (Morano *et al.*, 2011). O  $H_2O_2$  foi escolhido devido ao seu elevado poder oxidante e capacidade de indução de acumulação nuclear destes dois factores de transcrição (Kuge *et al.*, 1997; Boisnard *et al.*, 2009).

Como se pode observar na Figura 3.3, após o tratamento com coumarina e umbeliferona (isoladamente) não se verificou alteração na distribuição intracelular do Yap1-GFP e Msn2-GFP, que se manteve homogénea e comparável à que se obteve no controlo sem adição de composto (controlo negativo). No controlo positivo (tratamento com  $H_2O_2$ ) verificou-se acumulação nuclear dos factores de transcrição na ordem dos 50%, o que permite validar estas estirpes para a capacidade de activação dos mecanismos antioxidantes via Yap1 e Msn2. Assim, o resultado obtido para a coumarina e umbeliferona mostra que, nas condições testadas, estes compostos não têm a capacidade de induzir a resposta antioxidante mediada por estes factores de transcrição.

Nos tratamentos combinados efectuados com  $H_2O_2$  verificou-se um ligeiro aumento na percentagem de células com acumulação nuclear, cerca de 10%, nas células pré-expostas à coumarina relativamente às tratadas só com  $H_2O_2$  (Figura 3.3).

No caso da pré-exposição das células à umbeliferona, não se detectaram diferenças na percentagem de células com acumulação nuclear de Yap1-GFP comparativamente ao tratamento só com  $H_2O_2$  e, para o Msn2-GFP, verificou-se uma diminuição (cerca de 10%) dessa acumulação nuclear (Figura 3.3). A redução do período de tratamento com  $H_2O_2$ , nos ensaios combinados, de 60 para 10 minutos não alterou o padrão de resultados (dados não mostrados devido a falha técnica do equipamento de aquisição de imagem).



**Figura 3.3** Distribuição intracelular do Yap1-GFP e Msn2-GFP após exposição à coumarina, umbeliferona e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **(A)** Células expressando as proteínas quiméricas Yap1-GFP e MSN2-GFP foram expostas à coumarina 2,5mM, umbeliferona 2,5mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM e solvente (controlo negativo), conforme descrito em materiais e métodos. A distribuição celular de Yap1-GFP e Msn2-GFP e a localização do núcleo (DAPI) foi monitorizada através de microscopia de fluorescência. **(B)** Percentagem de células que apresentam acumulação nuclear de Yap1-GFP ou Msn2-GFP, em relação ao total de células fluorescentes, monitorizada através de microscopia de fluorescência. Estes valores resultam da observação de aproximadamente 200 células por tratamento em dois ensaios independentes.

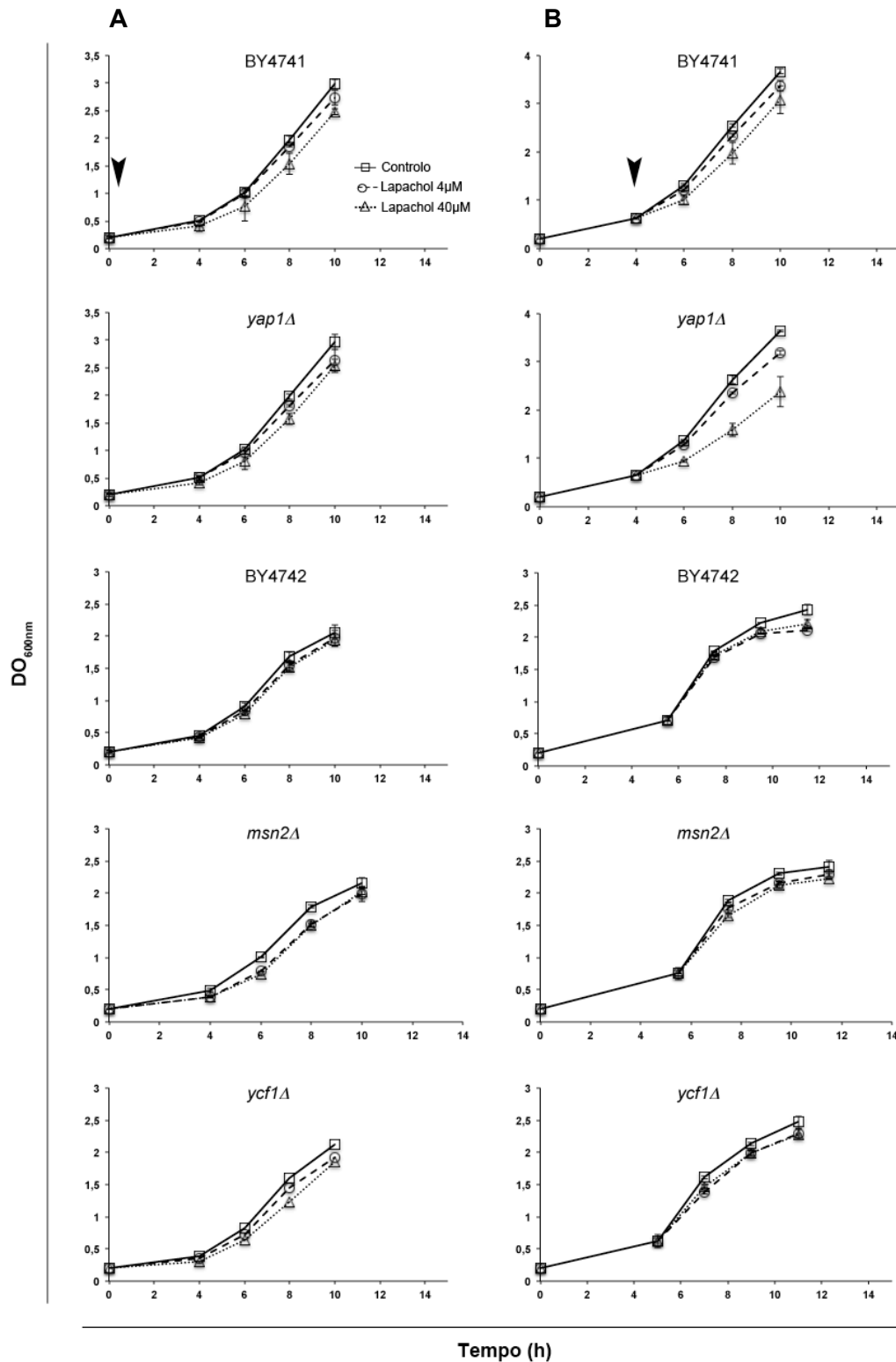
### 3.2 Lapachol

#### 3.2.1 O mutante *yap1Δ* exhibe hipersensibilidade ao lapachol

Embora o mecanismo de acção do lapachol não esteja claramente estabelecido, a capacidade de indução de stresse oxidativo é apontada como uma das suas características mais interessantes (Almeida, 2009; Bolton *et al.*, 2000; Hussain *et al.*, 2007; Kumagai *et al.*, 1997). Está descrito que um dos possíveis mecanismos de destoxificação de naftoquinonas, como por exemplo a plumbagina e menadiona, se faz através da sua conjugação com GSH (Castro *et al.*, 2007; Mauzeroll e Bard, 2004; Rodriguez *et al.*, 2004). Assim, neste estudo procurou-se avaliar o efeito da 1,4-naftoquinona, lapachol, na proliferação celular de *S. cerevisiae* e, identificar diferentes fenótipos de sensibilidade, utilizando estirpes selvagem e deletadas para genes *YAP1* e *MSN2* e para um transportador vacuolar envolvido no transporte compostos conjugados a GSH (*YCF1*).

O efeito do lapachol foi monitorizado através da sua adição no início da cultura e quando as células se encontravam em fase de crescimento exponencial. As curvas de crescimento (Figura 3.4) mostram que após exposição ao lapachol na concentração mais elevada, se verificou um ligeiro atraso no crescimento em relação ao controlo. Esse efeito foi particularmente evidente na estirpe *yap1Δ*, quando o composto foi adicionado às células no início da fase exponencial, traduzindo-se num prolongamento do tempo de geração na ordem dos 70 minutos (Tabela 3.1), isto é, as células *yap1Δ* expostas ao lapachol durante a fase exponencial apresentaram um tempo de duplicação de cerca de 190 minutos enquanto que no controlo, a duplicação celular se fez em apenas 119 minutos. Este efeito difere do comportamento da estirpe isogénica selvagem (BY4741) cujo prolongamento do tempo de geração após exposição ao lapachol não ultrapassou os 30 minutos. Nas restantes estirpes o efeito foi mais moderado não havendo um aumento significativo do tempo de geração após exposição.

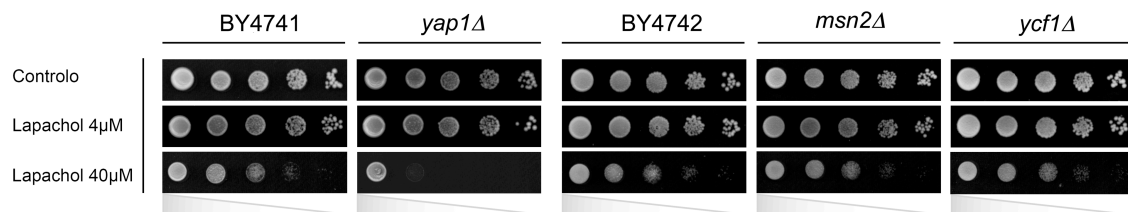
Os comportamentos de sensibilidade das várias estirpes ao lapachol foram posteriormente avaliados através do plaqueamento em *spots*. Os resultados obtidos são consistentes com as curvas de crescimento (Figura 3.4) uma vez que a estirpe *yap1Δ* foi a mais sensível, demonstrando uma hipersensibilidade ao lapachol (Figura 3.5) na concentração mais elevada, com o desaparecimento de quatro *spots* comparativamente ao seu controlo. No entanto, ainda que de uma forma mais moderada, todas as outras estirpes, apresentaram sensibilidade ao lapachol na concentração mais elevada, com o desaparecimento de um *spot* face aos respectivos controlos, não se observando diferenças significativas entre a estirpe selvagem (BY4742) e os mutantes *msn2Δ* e *ycf1Δ* (Figura 3.5).



**Figura 3.4** Curvas de crescimento das estirpes de *S. cerevisiae* na presença de lapachol. Iniciaram-se culturas em meio SC ao qual se adicionou lapachol no início da cultura **(A)** ou no início da fase exponencial **(B)**, conforme descrito em material e métodos. A seta indica o momento da adição do composto. Em ambas as abordagens foram incluídas culturas controle. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes  $\pm$  erro padrão.

**Tabela 3.1** Tempo de geração das estirpes indicadas após a adição do lapachol no início da cultura ou na fase de crescimento exponencial. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes  $\pm$  erro padrão.

Estirpe	Adição do composto	Tratamento	Tempo de geração (minutos)
BY4741	Início da cultura	Controlo	122,9 $\pm$ 6,4
		Lapachol 40 $\mu$ M	127,2 $\pm$ 10,0
	Fase exponencial	Controlo	118,5 $\pm$ 2,3
		Lapachol 40 $\mu$ M	145,9 $\pm$ 9,5
<i>yap1</i> $\Delta$	Início da cultura	Controlo	123,3 $\pm$ 1,3
		Lapachol 40 $\mu$ M	124,7 $\pm$ 0,2
	Fase exponencial	Controlo	119,3 $\pm$ 1,2
		Lapachol 40 $\mu$ M	190,6 $\pm$ 20
BY4742	Início da cultura	Controlo	126,2 $\pm$ 5,4
		Lapachol 40 $\mu$ M	130,8 $\pm$ 10,2
	Fase exponencial	Controlo	89,0 $\pm$ 0,1
		Lapachol 40 $\mu$ M	93,1 $\pm$ 3,3
<i>msn2</i> $\Delta$	Início da cultura	Controlo	129,1 $\pm$ 0,7
		Lapachol 40 $\mu$ M	121,7 $\pm$ 1,5
	Fase exponencial	Controlo	90,4 $\pm$ 2,3
		Lapachol 40 $\mu$ M	106,00 $\pm$ 7,9
<i>ycf1</i> $\Delta$	Início da cultura	Controlo	117,9 $\pm$ 7,4
		Lapachol 40 $\mu$ M	118,8 $\pm$ 5,2
	Fase exponencial	Controlo	86,7 $\pm$ 0,1
		Lapachol 40 $\mu$ M	103,1 $\pm$ 1,3

**Figura 3.5** Fenótipos de sensibilidade ao lapachol. As estirpes BY4741 (selvagem), *yap1* $\Delta$ , BY4742 (selvagem), *msn2* $\Delta$  e *ycf1* $\Delta$  foram comparadas através de ensaio de *spots* para a sua capacidade de crescer em meio SC sólido suplementado com lapachol nas concentrações indicadas, conforme descrito em material e métodos. Em cada painel o primeiro *spot* (a partir da esquerda) corresponde a cerca de  $3 \times 10^5$  células, seguindo-se as diluições decimais.

Estes resultados mostram que *S. cerevisiae* é sensível ao lapachol e, o facto de a estirpe mutante *yap1* $\Delta$  demonstrar hipersensibilidade, sugere a existência de um mecanismo de indução de stresse oxidativo em que o activador Yap1 desempenhe um papel crucial na resposta celular a essa condição de stresse.

### 3.2.2 A exposição ao lapachol induz acumulação nuclear dos factores de transcrição Yap1 e Msn2

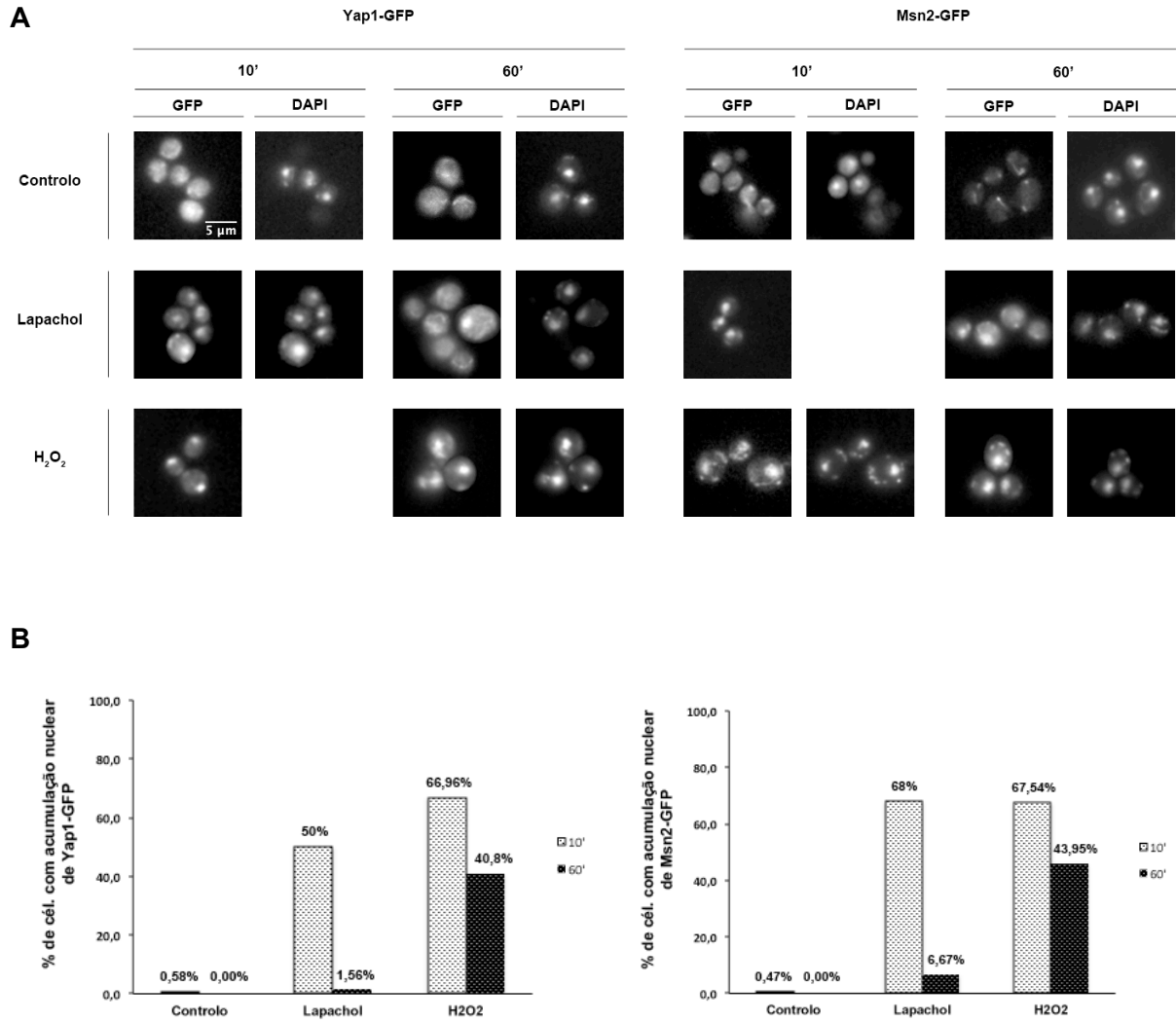
Tendo em conta os resultados descritos anteriormente, avaliámos a capacidade do lapachol induzir uma resposta antioxidante na célula via Yap1 e/ou Msn2, utilizando proteínas quiméricas Yap1-GFP e Msn2-GFP e monitorizando a sua localização intracelular após exposição ao composto através de microscopia de fluorescência.

Como se pode verificar na Figura 3.6, na ausência de lapachol, as células exibem uma distribuição difusa de ambas as proteínas quiméricas. Após 10 minutos de exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (controlo positivo) verificou-se uma acumulação nuclear de ambos os factores de transcrição em aproximadamente 60% das células, no entanto, após 60 minutos de exposição verificou-se uma redistribuição intracelular das proteínas, com consequente diminuição da percentagem de células com acumulação nuclear (cerca de 40%). Estes resultados são consistentes com os descritos na literatura relativamente à cinética da translocação nuclear destes factores após exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Delaunay *et al.*, 2000; Kuge *et al.*, 1997; Purvis e Lahav, 2013).

Relativamente ao tratamento com lapachol, após 10 minutos de tratamento, verificou-se acumulação nuclear de ambos os factores de transcrição em mais de 50% das células (Figura 3.6). No caso da estirpe Msn2-GFP essa acumulação nuclear foi idêntica à verificada para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mais de 60%), no entanto, após 60 minutos de tratamento, verificou-se uma redistribuição celular das duas proteínas, traduzida por uma localização celular difusa na quase totalidade das células.

Estes resultados demonstram que o lapachol tem a capacidade de induzir uma rápida acumulação nuclear destes dois factores de transcrição, essenciais na resposta a stresse oxidativo, e que essa resposta é reversível uma vez que após 60 minutos de exposição a distribuição nuclear não é mantida.





**Figura 3.6** Distribuição intracelular do Yap1-GFP e Msn2-GFP após exposição ao lapachol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **(A)** Células expressando as proteínas quiméricas Yap1-GFP e MSN2-GFP foram expostas ao lapachol 40μM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1mM e solvente (controlo negativo) durante 10 e 60 minutos, conforme descrito em materiais e métodos. A distribuição celular de Yap1-GFP e Msn2-GFP e a localização do núcleo (DAPI) foi monitorizada através de microscopia de fluorescência. **(B)** Percentagem de células que apresentam acumulação nuclear de Yap1-GFP ou Msn2-GFP, em relação ao total de células fluorescentes, monitorizada através de microscopia de fluorescência. Estes valores resultam da observação média de 200 células por tratamento.

## 4. DISCUSSÃO

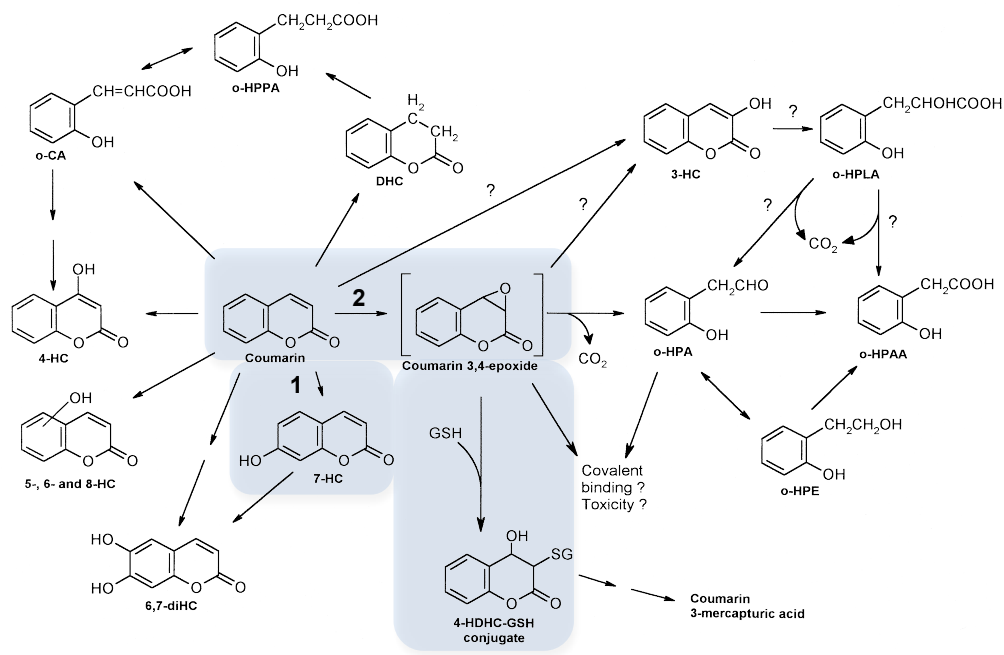
### 4.1 Potencial pró-oxidante da coumarina

As coumarinas incluem um vasto grupo de compostos fenólicos presentes em diversas espécies de plantas para os quais têm sido descritas diversas características biológicas, entre as quais actividade antimicrobiana. Esta característica tem sido avaliada através de diferentes abordagens, metodologias e compostos derivados o que por vezes conduz a resultados contraditórios tornando difícil a sua comparação. Por exemplo, alguns autores descrevem actividade antifúngica em *Candida albicans* para a coumarina e umbeliferona (Navarro-García *et al.*, 2011; Sardari *et al.*, 1999) no entanto, Ojala e colaboradores (2000) usando concentrações idênticas, mas um método diferente, não detectaram qualquer efeito. Ainda mais paradigmática é a avaliação da actividade da umbeliferona no fungo patogénico de plantas *Botrytis cinerea*, para o qual já foram descritas actividade estimulatória, inibitória ou nenhuma actividade (Bai *et al.*, 2012; Ojala *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2003).

Segundo Sardari e colaboradores (1999), a actividade biológica das coumarinas é claramente influenciada pelo padrão de substituição do anel aromático, sendo que um grupo -OH livre na posição 6 parece ser importante para a actividade antifúngica, enquanto que na posição 7 parece ser importante na actividade antibacteriana.

O tipo de metabolismo e/ou excreção a que estes compostos estão sujeitos pode variar entre espécies o que, consequentemente, conduz a diferenças de toxicidade (Lake, 1999). O metabolismo da coumarina tem sido investigado *in vivo* e *in vitro* em várias espécies de mamíferos nomeadamente no homem, no entanto, pouco se sabe acerca dos mecanismos de acção, metabolismo e excreção deste composto (e derivados) em microrganismos.

Das várias vias metabólicas que estão descritas para a coumarina duas das mais importantes envolvem 1) a hidroxilação do anel aromático na posição 7, dando origem ao composto 7-hidroxycoumarina, e 2) a abertura do anel lactónico com posterior clivagem do carbono 2 originando CO<sub>2</sub>, envolvendo a formação de um intermediário 3,4-epóxido (Lake, 1999). Como se pode ver na Figura 4.1, um dos possíveis destinos deste intermediário é a conjugação com GSH, dando origem ao conjugado 4-hidroxidiidro-coumarina-glutationa (4-HDHC-GSH). Assim, os nossos resultados sugerem que esta possa ser uma das vias de destoxificação neste organismo, e que o transportador vacuolar glutatona S-conjugado Ycf1 possa estar envolvido neste processo, fazendo o efluxo do composto 4-HDHC-GSH para o vacúolo.



**Figura 4.1.** Esquema com algumas das vias do metabolismo da coumarina. 1) hidroxilação do anel aromático na posição 7 (via mais comum); 2) Formação do intermediário 3,4-epóxido e conjugação com GSH (adaptado de Lake, 1999).

As duas estirpes mais sensíveis à coumarina foram precisamente a *ycf1Δ*, que não possui esse transportador, e a *yap1Δ*, deletada para o factor de transcrição Yap1 envolvido na activação dos genes *YCF1* e *GSH1* (que codifica a  $\gamma$ -glutamyl-cisteína sintetase, essencial para a biossíntese de GSH) (Wemmie *et al.*, 1994; Wu e Moye-Rowley, 1994). Desta forma, a formação de conjugados poderá levar à diminuição dos níveis intracelulares de GSH contribuindo para uma alteração do potencial redox e, consequentemente, interferir no normal funcionamento dos mecanismos antioxidantes da célula, justificando o ligeiro aumento da percentagem de acumulação nuclear de Yap1-GFP e Msn2-GFP, observado no ensaio combinado com o  $H_2O_2$ . Num estudo recente, foi demonstrado que a exposição à coumarina aumenta a vulnerabilidade e morte celular de sementes de *Ipomoea triloba* durante a germinação, através da amplificação do stresse oxidativo resultante do normal metabolismo mitocondrial (Pergo e Ishii-Iwamoto, 2011). Não obstante esse ligeiro aumento de acumulação nuclear que se verificou no ensaio combinado com  $H_2O_2$ , os resultados obtidos na microscopia não foram os esperados para um composto com actividade pró-oxidante, no entanto, a não visualização de acumulação nuclear destes factores de transcrição pode ser consequência de uma escolha inadequada das condições de tratamento. Está descrito que estes factores de transcrição se acumulam no núcleo após exposição a compostos oxidantes ( $H_2O_2$  por exemplo) de uma forma reversível, *i.e.*, ao fim de algum tempo verifica-se a deslocalização nuclear (Delaunay *et al.*, 2000; Kuge *et al.*, 1997; Maeta *et al.*, 2007; Morano *et al.*,

2011). Idealmente deveriam ter sido testadas variações ao tratamento inicialmente estabelecido, por exemplo ao nível da sua duração, no entanto, isso não nos foi possível, devido a problemas técnicos verificados nos microscópios de fluorescência no período em que decorreram as experiências e que limitaram a sua utilização.

#### 4.2 Potencial antioxidante da umbeliferona

A umbeliferona é o principal metabolito da coumarina no homem, para o qual não está descrita toxicidade (Lake, 1999), no entanto, existem vários registos de actividade antimicrobiana (Duncan *et al.*, 1998; Godoy *et al.*, 2005; Navarro-García *et al.*, 2011; Oliva *et al.*, 2003; Sardari *et al.*, 1999; Shakeel-u-Reehana *et al.*, 2010). A actividade antifúngica da umbeliferona tem sido avaliada em diversas espécies mas com resultados bastante variáveis. Foi descrito um elevado efeito inibitório para alguns fungos patogénicos de plantas, tais como *Phomopsis viticola* e *Fusarium culmorum*, no entanto, noutros como *Colletotrichum gloeosporioides* ou *Phomopsis obscurans*, verificou-se o efeito exactamente oposto com estimulação do crescimento (Ojala *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2003). Relativamente à actividade da umbeliferona em *S. cerevisiae*, a informação disponível é escassa sendo que a única referência encontrada descreve ausência de actividade (Ojala *et al.*, 2000).

Neste estudo verificámos que, dependendo das estirpes, a umbeliferona pode induzir um ligeiro atraso do crescimento na fase de metabolismo fermentativo que, no entanto, é recuperado na fase de metabolismo respiratório, verificando-se, nessa fase, um efeito estimulatório face ao controlo. Este efeito “bi-fásico” foi anteriormente descrito em leveduras por Bahrim e colaboradores (Bahrim *et al.*, 2007), utilizando compostos carotenóides e flavonóides com características antioxidantes. Nesse estudo, os autores verificaram também um ligeiro atraso no crescimento nas primeiras 12h, com posterior adaptação das células e total recuperação após as 24h de incubação, que se reflectiu num aumento considerável na viabilidade celular a partir das 24h de cultura. Os autores atribuíram este aumento da viabilidade celular à diminuição da autólise, que se verificou após 24h-30h de tratamento comparativamente ao controlo.

Existem vários estudos que descrevem a umbeliferona como um composto com características antioxidantes, sendo que essa característica tem sido avaliada através de ensaios *in vitro* (Hoult e Payá, 1996; Kanimozhi *et al.*, 2011; Kaur *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2010; Stanojević *et al.*, 2009) ou *in vivo* com a utilização de eritrócitos ou leucócitos sujeitos a um stresse oxidativo (Kabeya *et al.*, 2013; Kanimozhi *et al.*, 2011; Ramesh e Pugalendi, 2005, 2006, 2007). Nestes estudos foi demonstrado que a umbeliferona tem a capacidade de neutralizar radicais hidroxilo (HO<sup>•</sup>) e inibir a formação do anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), apresentando um poder antioxidante semelhante ao ácido ascórbico. Ramesh e Pugalendi (2006) demonstraram que

a umbeliferona desempenha um papel protector na peroxidação dos lípidos em ratos diabéticos, através da neutralização de ERO e, elevando os níveis reduzidos de antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos), para níveis próximos do normal.

Embora não nos tenha sido possível demonstrar, através do ensaio de microscopia, a actividade antioxidante da umbeliferona neste sistema biológico, os resultados obtidos nos ensaios de sobrevivência são coerentes com essa característica e sugerem-nos que a umbeliferona possa desempenhar um papel protector nas células, quando estas se encontram na fase de metabolismo respiratório, isto é, quando existe maior produção e acumulação de ERO. Estas espécies reactivas de oxigénio, são geradas em condições fisiológicas e anuladas através de vários sistemas antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) mantendo-se um equilíbrio redox nas células (Halliwell, 2001). Quando esse equilíbrio é afectado, quer seja por aumento da concentração de compostos oxidantes ou pela diminuição/inexistência dos sistemas antioxidantes, é estabelecida uma situação de stresse oxidativo (Sies, 1996). A estirpe *yap1Δ* enquadra-se neste segundo cenário uma vez que o factor de transcrição Yap1 é essencial para a síntese de vários antioxidantes, tais como tioredoxina (Kuge e Jones, 1994), glutathione ou glutathione redutase (Grant *et al.*, 1996; Wu e Moye-Rowley, 1994), pelo que na sua ausência, um composto exógeno com características antioxidantes seria vantajoso para a reposição do equilíbrio redox.

Neste trabalho, utilizámos estirpes deletadas para genes que codificam transportadores envolvidos na resistência a múltiplas drogas (MDR - *MultiDrug Resistance*), não apenas na expectativa de identificar mecanismos de destoxificação destes compostos, mas também na tentativa de eliminar/diminuir a sua extrusão e, desta forma, potenciar os seus efeitos, “forçando-os” a permanecer no meio intracelular. Assim, considerando que a umbeliferona possa ter um papel antioxidante na célula, o resultado obtido para a estirpe *flr1Δ*, sugere-nos que o transportador Flr1, possa estar envolvido na sua destoxificação, uma vez que não havendo o seu efluxo da célula, a umbeliferona ser-lhe-á benéfica, quando nesta houver produção/acumulação de ERO (na fase de metabolismo respiratório).

O facto de estar descrito que o Yap1 está, directa ou indirectamente, envolvido na activação do *FLR1* em resposta a vários tipos de compostos tais como diamida, dietilmaleato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, cicloheximida, ou benomil (Alarco *et al.*, 1997; Nguyễn *et al.*, 2001; Tenreiro *et al.*, 2001), leva-nos a pensar que os resultados obtidos em ambas as estirpes mutantes *yap1Δ* e *flr1Δ*, possam estar de alguma forma relacionados. Se, à semelhança do que acontece na resposta ao benomil (Tenreiro *et al.*, 2001; Nguyễn *et al.*, 2001), a activação do *FLR1* estiver comprometida numa estirpe *yap1Δ*, não se verificará o efluxo da umbeliferona, originando, nesta estirpe, um efeito duplamente positivo pelas razões descritas anteriormente. Isto poderá justificar o facto de nas outras estirpes não se verificarem diferenças significativas

relativamente ao controlo, após 24h de tratamento com umbeliferona, já que em todas elas a expressão de *FLR1* não deverá estar afectada, verificando-se a sua destoxificação.

#### 4.3 Potencial pró-oxidante do lapachol

O lapachol é uma naftoquinona natural para o qual estão descritas inúmeras actividades biológicas e, embora não estejam ainda completamente definidos, há indicações de que sejam vários os tipos de mecanismos através dos quais exerce os seus efeitos (Moura *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2003).

Neste estudo avaliámos o potencial antifúngico do lapachol em *S. cerevisiae*, utilizando estirpes, com diferentes genótipos, que nos permitissem uma melhor elucidação acerca dos seus mecanismos de acção.

Os nossos resultados mostram que o lapachol possui actividade antifúngica em *S. cerevisiae*, o que está de acordo com estudos anteriores onde foi demonstrada actividade antifúngica em *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium oxysporum* e *Paracoccidioides brasiliensis*, em alguns casos com resultados superiores aos obtidos com o antifúngico cetoconazol (Guiraud *et al.*, 1993; Souza *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2008). No entanto, os dados da literatura não são consensuais, por exemplo, Gonçalves de Lima e colaboradores (1992) observaram que o lapachol era inactivo nos géneros *Candida* e *Cryptococcus* e Antunes e colaboradores (2006) também não observaram qualquer inibição do crescimento de *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Estas variações nos resultados podem estar relacionadas com diferenças nos protocolos experimentais.

Embora alguns autores sugiram que a interacção com a membrana celular possa ser um dos mecanismos de acção do lapachol (Hussain *et al.*, 2007; Almeida, 2009), na literatura, não encontrámos nenhuma evidência que suporte essa observação, nem mesmo nas referências citadas por esses autores (Guiraud *et al.*, 1994; Nagata *et al.*, 1998; Portillo *et al.*, 2001). Tendo em conta as características químicas do composto e os estudos desenvolvidos noutros organismos, nomeadamente em *Trypanosoma cruzi*, (Pinto e Castro, 2009; Salas *et al.*, 2008), os resultados que obtivemos sugerem-nos que o mecanismo de acção do lapachol em *S. cerevisiae* envolva indução de stresse oxidativo.

Verificámos neste trabalho, que a estirpe mais sensível ao lapachol foi a *yap1Δ*, o que é consistente com a presença de um composto que induza stresse oxidativo, uma vez que estudos anteriores demonstraram que mutantes *yap1Δ* são hipersensíveis a compostos oxidantes na fase exponencial (Coleman *et al.*, 1999; Jamieson *et al.*, 1994; Kuge e Jones, 1994; Schnell *et al.*, 1992). A indução de stresse oxidativo é, aliás, o mecanismo de acção apontado como sendo o responsável pela actividade antitripanocítica das naftoquinonas (nomeadamente o lapachol) (Salas *et al.*, 2011). Estudos anteriores, mostram que em *T. cruzi*, o lapachol sofre

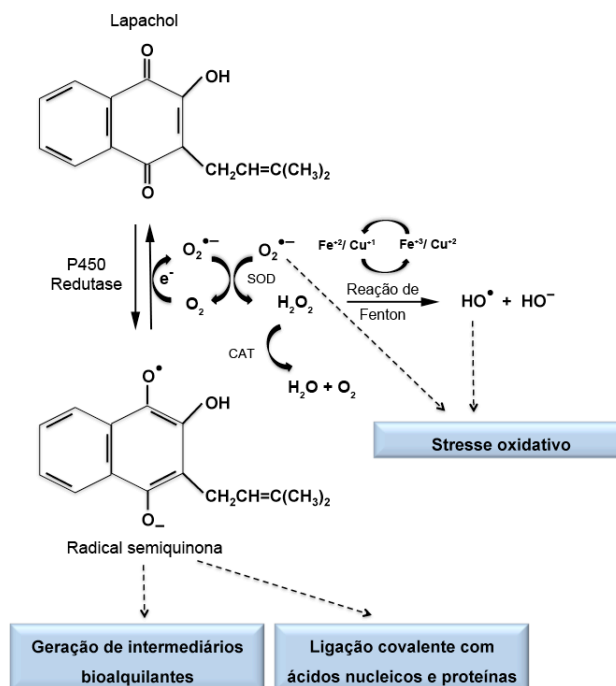
uma bioactivação mediada pelo P<sub>450</sub> reductase, levando à formação de ERO, via ciclo redox, que são particularmente tóxicas para este organismo, na medida em que possuem uma limitada capacidade enzimática para as metabolizar (Hall *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2004; Salas *et al.*, 2008; Salas *et al.*, 2011).

Está descrito que na presença de oxigénio, o lapachol interfere no transporte de electrões, levando à formação intracelular de ERO, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HO<sup>•</sup> e o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Kumagai *et al.*, 1997; Kumagai e Shimojo, 2002; Silva *et al.*, 2003) e que este último, pode ser gerado, em levedura, através de compostos que sofrem ciclo redox, como é o caso da quinona menadiona (Morano *et al.*, 2011), o que nos sugere que este possa ser o mecanismo de indução de stresse oxidativo do lapachol em *S. cerevisiae*.

Em sistemas onde ocorra uma persistência do ciclo redox, ou então, cujos mecanismos de resposta antioxidante se encontrem afectados (como é o caso da estirpe *yap1Δ*), o aumento intracelular destas espécies reactivas pode levar ao comprometimento de componentes celulares importantes com implicações, por exemplo, ao nível da divisão celular e consequente atraso na progressão do ciclo celular (Shackelford *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2003), o que é consistente com o prolongamento do tempo de geração que se verificou na estirpe *yap1Δ* na presença de lapachol. A Figura 4.2 representa a presumível activação metabólica e ciclo redox do lapachol com redução catalítica do oxigénio e formação de ERO.

Os resultados observados na microscopia confirmam que o lapachol induz uma rápida activação dos factores de transcrição Yap1 e Msn2, à semelhança do que acontece, por exemplo, com outros compostos oxidantes como sejam o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menadiona ou diamida (Yamamoto *et al.*, 2007). No entanto, embora se tenha verificado uma rápida e intensa acumulação nuclear do Msn2, não se detectaram diferenças nos fenótipos de sensibilidade ao lapachol entre as estirpes selvagem e *msn2Δ*. Este facto poderá ser explicado pela ocorrência de alguma redundância que se verifica ao nível da resposta antioxidante mediada pelos factores de transcrição Msn2 e Msn4 (Estruch e Carlson, 1993; Estruch, 2000; Morano *et al.*, 2011). Martinez-Pastor e colaboradores (1996) demonstraram que apenas os duplos mutantes *msn2/msn4* exibem hipersensibilidade a stresse oxidativo severo, sugerindo que possam apresentar uma redundância parcial na resposta ao stresse.

Não detectámos diferenças de sensibilidade entre a estirpe selvagem e a *ycf1Δ*, o que nos sugere que o transportador vacuolar Ycf1 não esteja envolvido no mecanismo de destoxificação do lapachol, seja porque este não forma conjugados com GSH, ou porque o efluxo desses conjugados é assegurado por outro transportador. Foi demonstrado por Klein e colaboradores (2002) que, à semelhança do Ycf1, também o Bpt1 é um transportador vacuolar de compostos conjugados a glutatona e que juntos, são os maiores intervenientes da sequestração vacuolar destes conjugados em levedura.



**Figura 4.2** Esquema do ciclo redox induzido pelo lapachol. (Adaptado de Kumagai e Shimojo, 2002; Silva *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2010).

#### 4.4 Conclusão

Neste estudo verificámos que os compostos naturais coumarina, umbeliferona e lapachol exibem diferentes actividades em *S. cerevisiae*. A coumarina e o lapachol apresentam um efeito inibitório do crescimento celular, enquanto que a umbeliferona pode exibir um efeito estimulatório, na fase de metabolismo respiratório. Os resultados obtidos permitiram, ainda, identificar possíveis mecanismos de acção e destoxificação para estes compostos em levedura, que poderão estar relacionados com actividades pró-oxidantes/antioxidantes, no entanto, serão necessários estudos adicionais para testar estas hipóteses.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, A.K., Rogers, P.D., Baerson, S.R., Jacob, M.R., Barker, K.S., Cleary, J.D., Walker, L. a, Nagle, D.G., Clark, A.M., 2003. Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 278, 34998–5015.
- Alarco, A., Balan, I., Talibi, D., Mainville, N., Raymond, Martine, 1997. AP1-mediated Multidrug Resistance in *Saccharomyces cerevisiae* Requires FLR1 Encoding a Transporter of the Major Facilitator Superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 272, 19304–19313.
- Almeida, E.R. De, 2009. Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and Beta-Lapachone. *The Open Natural Products Journal* 2, 42–47.
- Almeida, E., Silva, Alvaro, Santos, E., Lopes, C., 1990. Antiinflammatory action of lapachol. *Journal of ethnopharmacology* 29, 239–241.
- Antunes, R.M., 2006. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16, 517-524.
- Aslam, K., Khosa, M.K., Jahan, N., Nosheen, S., 2010. Synthesis and applications of Coumarin. Short communication: *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* 23, 449–54.
- Baglin, T., 1998. Management of warfarin (coumarin) overdose. *Blood reviews* 12, 91–8.
- Bahrim, G., Geanta, R., Bleoanca, I., 2007. The metabolic response of yeast as a model organism to *Epilobium nigrum* pigments' antioxidant activity. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 1 (30), 13-23.
- Bai, X., Liang, W., Cheng, J., Ma, L., Liu, Y., Shi, G., Wang, Y., Gu, J., 2012. Inhibitory effect and antifungal mechanism of umbelliferone on plant pathogenic fungi. *Information technology and agricultural engineering. Advances in intelligent and soft computing* 134, 693-702.
- Batova, M., Klobucnikova, V., Oblasova, Z., Gregan, J., Zahradnik, P., Hapala, I., Subik, J., Schüller, C., 2010. Chemogenomic and transcriptome analysis identifies mode of action of the chemosensitizing agent CTBT(7-chlorotetrazolo[5,1-c]benzo[1,2,4]triazine). *BMC Genomics* 11:153.
- Bharucha, N., Kumar, A., 2007. Yeast genomics and drug target identification. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 10, 618–34.
- Boisnard, S., Lagniel, G., Garmendia-Torres, C., Molin, M., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M., Toledano, Michel B, Labarre, J., Chédin, S., 2009. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates the nuclear localization of Msn2 and Maf1 through thioredoxins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* 8, 1429–38.
- Bolton, J.L., Trush, M. a, Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J., 2000. Role of quinones in toxicology. *Chemical research in toxicology* 13, 135–60.
- Botstein, D., Fink, G.R., 2011. Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* 189, 695–704.
- Bruneton, 1999. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. 2<sup>a</sup> Ed. Paris/London: Lavoisier Publishing/Intercept Ltd.
- Castellanos, J.R., Prieto, J.M., Heinrich, M., 2009. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) - A global ethnopharmacological commodity? *Journal of ethnopharmacology* 121, 1–13.
- Castro, F.A.V., Herdeiro, R.S., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A, Pereira, M.D., 2007. Menadione stress in *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient in the glutathione transferases. *Biochimica et biophysica acta* 1770, 213–20.
- Coleman, S.T., Epping, E.A., Steggerda, S.M., Moye-Rowley, W.S., 1999. Yap1p activates gene transcription in an oxidant-specific fashion. *Molecular and cellular biology* 19, 8302–13.
- Costanzo, M., A. Baryshnikova, J. Bellay, Y. Kim, E. D. Spear et al., 2010 The genetic landscape of a cell. *Science* 327, 425-431.

- Cooke, D., 1998. Studies on the mode of action of coumarins (coumarin, 6-hydroxycoumarin, 7-hydroxycoumarin & esculetin) at a cellular level. Ph.D thesis. School of Biotechnology, Dublin City University, Ireland.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12, 564–82.
- Delaunay, A., Isnard, A., Toledano, M.B., 2000. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *The EMBO journal* 19, 5157–66.
- Dewick, P.M. 2009. Medical natural products. A biosynthetic approach. 3<sup>rd</sup> edition. Wiley. UK.
- Directiva do Conselho Europeu 88/388/EEC. Comissão Europeia.
- Dighe, N.S., Pattan, S.R., Dengale, S.S., Musmade, D.S., Shelar, M., Tambe, V., Hole, M.B. 2010. Synthetic and pharmacological profiles of coumarins: A review. *Scholars Research Library* 2, 65–71.
- Duncan, S.H., Flint, H.J., Stewart, C.S., 1998. Inhibitory activity of gut bacteria against *Escherichia coli* O157 mediated by dietary plant metabolites. *FEMS microbiology letters* 164, 283–8.
- Dunn, B.E., Cohen, H., Blaser, M.J., 1997. *Helicobacter pylori*. *Clinical microbiology reviews* 10, 720–41.
- Estruch, F., 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS microbiology reviews* 24, 469–86.
- Estruch, F., Carlson, M., 1993. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 13, 3872–81.
- Ferreira, V.F., 1996. Aprendendo sobre os conceitos de ácido e base. *Química Nova na Escola* 4.
- Fonseca, S., Braga, R., Santana, D., 2003. Lapachol – química, farmacologia e métodos de dosagem. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 84, 9–16.
- Galdieri, L., Mehrotra, S., Yu, S., Vancura, A., 2010. Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *Omics : a journal of integrative biology* 14, 629–38.
- Guiraud, P., Steiman, R., Campos-Takaki, G., Seigle-Murandi, F., Buochberg, M. 1993. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β-lapachone. *Planta Med.* 60, 373-374.
- Godoy, M.F.P. *et al.*, 2005. Inhibition of the Symbiotic Fungus of Leaf-Cutting Ants by Coumarins. Short Report. *Journal of brazilian chemical society* 16, 669–672.
- Grant, C M, Collinson, L.P., Roe, J.H., Dawes, I.W., 1996. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Molecular microbiology* 21, 171–9.
- Hall, B.S., Meredith, E.L., Wilkinson, S.R., 2012. Targeting the substrate preference of a type I nitroreductase to develop antitrypanosomal quinone-based prodrugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56, 5821–30.
- Halliwell, B., 2001. Free Radicals and other reactive species in Disease. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–7.
- Henry, T.R., Wallace, K.B., 1996. Differential mechanisms of cell killing by redox cycling and arylating quinones. *Archives of toxicology* 70, 482–9.
- Hodek, P., Krízková, J., Burdová, K., Sulc, M., Kizek, R., Hudecek, J., Stiborová, M., 2009. Chemopreventive compounds - view from the other side. *Chemico-biological interactions* 180, 1–9.
- Hohmann, S., Mager, W.H., 2003. Yeast Stresse responses. *Topics in Current Genetics* 1, 1–9.
- Hoult, J.R., Payá, M., 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General pharmacology* 27, 713–22.
- Hussain, H., Krohn, K., Ahmad, U., Miana, A., Green, I., 2007. Lapachol: an overview. *Arkivoc* (ii), 145–171.

- Jamieson, D.J., Rivers, S.L., Stephen, D.W., 1994. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology* 140, 3277–83.
- Ji, H., Li, X., Zhang, H., 2009. Natural products and drug discovery. *Embo reports* 10, 194–200.
- Kabeya, L.M. *et al.*, 2013. 7-Hydroxycoumarin modulates the oxidative metabolism, degranulation and microbial killing of human neutrophils. *Chemico-biological interactions* 206, 63–75.
- Kanimozhi, G., Prasad, N.R., Ramachandran, S., Pugalendi, K.V., 2011. Umbelliferone modulates gamma-radiation induced reactive oxygen species generation and subsequent oxidative damage in human blood lymphocytes. *European journal of pharmacology* 672, 20–9.
- Kaur, P., Kumar, M., Singh, B., Kumar, S., Kaur, S., 2012. Amelioration of oxidative stress induced by oxidative mutagens and COX-2 inhibitory activity of umbelliferone isolated from *Glycyrrhiza glabra* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2, S120–S126.
- Khan, A., Ahmad, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L.A., Manzoor, N., 2011. Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS yeast research* 11, 114–22.
- klein, M., Mamnum, Y., Eggmann, T., Schuller, C., Wolfger, H., Martinoia, M., Kuchler, K., 2002. The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast. *FEBS letters* 520, 63–67.
- Kuge, S., Jones, N., 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *The EMBO journal* 13, 655–64.
- Kuge, S., Jones, N., Nomoto, a., 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *The EMBO journal* 16, 1710–20.
- Kumagai, Y., Tsurutani, Y., Shinyashiki, M., Homma-Takeda, S., Nakai, Y., Yoshikawa, T., Shimojo, N., 1997. Bioactivation of lapachol responsible for DNA scission by NADPH-cytochrome P450 reductase. *Environmental toxicology and pharmacology* 3, 245–50.
- Kumagai, Y., Shimojo, N., 2002. Possible mechanisms for induction of oxidative stress and suppression of systemic nitric oxide production caused by exposure to environmental chemicals. *Environmental health and preventive medicine* 7, 141–50.
- Lacy, A., O’Kennedy, R., 2004. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Current pharmaceutical design* 10, 3797–811.
- Lake, B.G., 1999. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. *Food and chemical toxicology* 37, 423–453.
- Li, Z.-S., Szczypka, M., Lu, Y.-P., Thiele, Dennis J., Rea, P.A., 1996. The Yeast Cadmium Factor Protein (YCF1) Is a Vacuolar Glutathione S-Conjugate Pump. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 6509–6517.
- Lima, N.M.F., Correia, C.S., Leon, L.L., Machado, G.M.C., Madeira, M.D.F., Santana, A.E.G., Goulart, M.O.F., 2004. Antileishmanial activity of lapachol analogues. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 757–61.
- Lopez, A., Parsons, A.B., Nislow, C., Giaever, G., Boone, C., 2008. Chemical-genetic approaches for exploring the mode of action of natural products. *Progress in Drug Research* 66, 238–271.
- Lopez-Gonzalez, J.S., Prado-Garcia, H., Aguilar-Cazares, D., Molina-Guarneros, J. a, Morales-Fuentes, J., Mandoki, J.J., 2004. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung cancer* 43, 275–83.
- Maeta, K., Nomura, W., Takatsume, Y., Izawa, S., Inoue, Y., 2007. Green tea polyphenols function as prooxidants to activate oxidative-stress-responsive transcription factors in yeasts. *Applied and environmental microbiology* 73, 572–80.
- Mauzeroll, J., Bard, A.J., 2004. Scanning electrochemical microscopy of menadione-glutathione conjugate export from yeast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7862–7.

- Mazid, M., Khan, T., Mohammad, F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and medicine* 3, 232–249.
- Mazzei, M., *et al.*, 2008. Activity of Mannich bases of 7-hydroxycoumarin against Flaviviridae. *Bioorganic & medicinal chemistry* 16, 2591–605.
- Monteiro, J.P., 2006. Oxidative stress-signaling and YAP1 transactivation. Ph.D, Bioquímica (Genética Molecular), Departamento de Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Morano, K.A., Grant, Chris M, Moye-rowley, W.S., 2011. The response to heat s shock and oxidative stresse in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1-109
- Morschhäuser, J., 2010. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal genetics and biology* 47, 94–106.
- Moura, K.C.G. De, Emery, F.S., Neves-pinto, C., Pinto, C.F.R., Dantas, A.P., Salomão, K., Castro, Solange L De, Pinto, A. V, 2001. Trypanocidal Activity of Isolated Naphthoquinones from *Tabebuia* and Some Heterocyclic Derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.* 12, 325–338.
- Nagata, K., Hirai, K.I., Koyama, J., Wada, Y., Tamura, T., 1998. Antimicrobial activity of novel furanonaphthoquinone analogs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42, 700–2.
- Navarro-García, V.M., Rojas, G., Avilés, M., Fuentes, M., Zepeda, G., 2011. *In vitro* antifungal activity of coumarin extracted from *Loeselia mexicana* Brand. *Mycoses* 54, e569–71.
- Nguyen, D.T., Alarco, a M., Raymond, M, 2001. Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator *FLR1* gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *The Journal of biological chemistry* 276, 1138–45.
- Niehues, M., Barros, V.P., Emery, F.D.S., Dias-Baruffi, M., Assis, M.D.D., Lopes, N.P., 2012. Biomimetic *in vitro* oxidation of lapachol: a model to predict and analyse the in vivo phase I metabolism of bioactive compounds. *European journal of medicinal chemistry* 54, 804–12.
- Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K., Vuorela, P., 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of ethnopharmacology* 73, 299–305.
- Oliva, A., Meepagala, K.M., Wedge, D.E., Harries, D., Hale, A.L., Aliotta, G., Duke, S.O., 2003. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 890–6.
- Otten, S., Rosazza, J.P., 1978. Microbial transformations of natural antitumor agents: oxidation of lapachol by *Penicillium notatum*. *Applied and environmental microbiology* 35, 554–7.
- Otten, S., Rosazza, J.P., 1979. Microbial transformations of natural antitumor agents: conversion of lapachol to dehydro-alpha-lapachone by *Curvularia lunata*. *Applied and environmental microbiology* 38, 311–3.
- Parveen, M., Hasan, M.K., Takahashi, J., Murata, Y., Kitagawa, E., Kodama, O., Iwahashi, H., 2004. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 54, 46–55.
- Payá, M., Halliwell, B., Hout, J., 1992. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochemistry pharmacology* 44, 205-214.
- Pergo, E.M., Ishii-Iwamoto, E.L., 2011. Changes in energy metabolism and antioxidant defense systems during seed germination of the weed species *Ipomoea triloba* L. and the responses to allelochemicals. *Journal of chemical ecology* 37, 500–13.
- Pinto, A.V., De Castro, S.L., 2009. The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. *Molecules* 14, 4570–90.
- Portillo, A., Vila, R., Freixa, B., Adzet, T., Cañigueral, S., 2001. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology* 76, 93–8.
- Purvis, J.E., Lahav, G., 2013. Encoding and decoding cellular information through signaling dynamics. *Cell* 152, 945–56.

- Qaddouri, B., Guaadaoui, A., Bellirou, A., Hamal, A., Melhaoui, A., Brown, G.W., Bellaoui, M., 2011. The Budding Yeast "*Saccharomyces cerevisiae*" as a Drug Discovery Tool to Identify Plant-Derived Natural Products with Anti-Proliferative Properties. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 954140.
- Qasheesh, M., nd. Practical application of some biological assay used in drug discovery, from natural products. PHG322 pratical course. Pharmacognosy department, #3, 1-14.
- Ramanathan, A., Schreiber, S.L., 2007. Multilevel regulation of growth rate in yeast revealed using systems biology. BioMed Central Minireview, Journal of Biology 6: 3
- Ramesh, B., Pugalendi, K.V., 2005. Impact of umbelliferone on erythrocyte redox status in STZ-diabetic rats. The Yale journal of biology and medicine 78, 131–138.
- Ramesh, B., Pugalendi, K.V., 2006. Antioxidant role of umbelliferone in STZ-diabetic rats. Life sciences 79, 306–310.
- Ramesh, B., Pugalendi, K.V., 2007. Influence of umbelliferone on membrane-bound ATPases in streptozotocin-induced diabetic rats. Pharmacological reports 59, 339–48.
- Rao, K. V, McBride, T.J., Oleson, J.J., 1968. Recognition and evaluation of lapachol as an antitumor agent. Cancer Research 28, 1952–1954.
- Riveiro, M.E., De Kimpe, N., Moglioni, a, Vázquez, R., Monczor, F., Shayo, C., Davio, C., 2010. Coumarins: old compounds with novel promising therapeutic perspectives. Current medicinal chemistry 17, 1325–38.
- Rodriguez, C.E., Shinyashiki, Masaru, Froines, J., Yu, R.C., Fukuto, J.M., Cho, A.K., 2004. An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. Toxicology 201, 185–196.
- Rogers, B., Decottignies, A., Kolaczowski, M., Carvajal, E., Balzi, E., Goffeau, A., 2001. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of molecular microbiology and biotechnology 3, 207–214.
- Sacau, E.P., Estévez-Braun, A., Ravelo, A.G., Ferro, E. a, Tokuda, H., Mukainaka, T., Nishino, H., 2003. Inhibitory effects of lapachol derivatives on Epstein-Barr virus activation. Bioorganic & medicinal chemistry 11, 483–488.
- Salas, C., Tapia, R., Ciudad, K., Orellana, M., Kemmerling, U., Ferreira, J., Diego, J., Morello, A., 2008. *Trypanosoma cruzi*: Activities of lapachol and a- and b-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. Bioorganic & medicinal chemistry 16, 668–674.
- Salas, C., Faúndez, M., Morello, A., Maya, J.D., Tapia, R., 2011. Natural and synthetic naphthoquinones active against *Trypanosoma cruzi*: an initial step towards new drugs for Chagas disease. Current medicinal chemistry 18, 144–161.
- Sanglard, D., 2002. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. Current opinion in microbiology 5, 379–385.
- Sardari, S., Mori, Y., Horita, K., Micetich, R.G., Nishibe, S., Daneshtalab, M., 1999. Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. Bioorganic & medicinal chemistry 7, 1933–1940.
- Schnell, N., Krems, B., Entian, K., 1992. The *PAR1* (*YAP1/SNQ3*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue , is involved in oxygen metabolism. Current genetics 21, 269–273.
- Shackelford, R., Kaufmann, W., Paules, R., 2000. Oxidative stresse and cell cycle checkpoint functions. Forum : Signal Transduction. Free radical biology & medicine 28, 1387–1404.
- Shakeel-u-Reehana, Khan, R., Bhat, K. a., Raja, A.F., Shawl, A.S., Alam, M.S., 2010. Isolation, characterisation and antibacterial activity studies of coumarins from *Rhododendron lepidotum* Wall. ex G. Don, Ericaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia 20, 886–890.
- Shapiro, R.S., Robbins, N., Cowen, L.E., 2011. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. Microbiology and molecular biology reviews 75, 213–67.
- Sherman, F., 2003. Getting Started with Yeast. Methods enzymology 350,3–41.

- Sies, H., 1996. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Experimental physiology* 82, 291-295.
- Silva, M., Ferreira, V., Souza, M., 2003. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na b-lapachona e derivados. *Química nova* 26, 407-416.
- Singh, R., Singh, B., Singh, S., Kumar, N., Kumar, S., Arora, S., 2010. Umbelliferone – An antioxidant isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex. Del. *Food Chemistry* 120, 825-830.
- Souza, M., Silva, A., Ferreira, M., Lemos, M., Ramos, R., Ferreira, A., Souza, R., 2008. Atividade biológica do lapachol e de alguns derivados sobre o desenvolvimento fúngico e em germinação de sementes. *Química nova* 31, 1670-1671.
- Souza, M.A., *et al.*, 2013. The antimicrobial activity of lapachol and its thiosemicarbazone and semicarbazone derivatives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 342-351.
- Stanojević, L., Stanković, M., Nikolić, V., Nikolić, L., Ristić, D., Canadanovic-Brunet, J., Tumbas, V., 2009. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. extracts. *Sensors* 9, 5702-5714.
- Teixeira, Miguel C, 2011. Complex Regulatory Interplay between Multidrug Resistance and oxidative stress response in Yeast: The *FLR1* regulatory Network as a systems biology Case-Study. Oxidative stress- molecular and biological effects, Dr. Volodymyr Lushchak (Ed.). InTech.
- Tenreiro, S., Fernandes, A., Sá-Correia, I., 2001. Transcriptional activation of *FLR1* gene during *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to growth with benomyl: role of Yap1p and Pdr3p. *Biochemical and biophysical research communications* 280, 216-222.
- Toledano, M. Delaunay, A., Diteau, B., Sepctor, D., Azevedo, D., 2003. Oxidative stress response in Yeast. *Topics in current genetics* 1. S Hohmann/P.W.H Mager (Eds.). Yeast stress responses, 241-303.
- Vasconcelos, J.F., Teixeira, M.M., Barbosa-Filho, J.M., Agra, M.F., Nunes, X.P., Giulietti, A.M., Ribeiro-Dos-Santos, R., Soares, M.B.P., 2009. Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation. *European journal of pharmacology* 609, 126-131.
- Wemmie, J.A., Moye-Rowley, W.S., 1997. Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* ATP-binding cassette transporter protein Ycf1p. *Molecular microbiology* 25, 683-94.
- Wemmie, J.A., Szczypka, M.S., Thiele, D J, Moye-Rowley, W.S., 1994. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, *YCF1*. *The Journal of biological chemistry* 269, 32592-32597.
- WHO, 2005. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicine. Report of a WHO global survey. World Health Organization, Geneva.
- Widelski, J., Popova, M., Graikou, K., Glowniak, K., Chinou, I., 2009. Coumarins from *Angelica lucida* L.-antibacterial activities. *Molecules* 14, 2729-34.
- Wu, A., Moye-Rowley, W.S., 1994. *GSH1*, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Molecular and cellular biology* 14, 5832-5841.
- Yamamoto, A., Ueda, J., Yamamoto, N., Hashikawa, N., Sakurai, H., 2007. Role of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryotic cell* 6, 1373-1382.

## 6. ANEXOS

### 6.1 COMPOSIÇÃO DE MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

#### Meio SC (Sintético Completo/selectivo)

##### Meio Líquido

- Glucose 2% (Merck®)
- YNB (*Yeast Nitrogen Base without amino acids*) 6,85% (BD®)
- SC mix: L- $\alpha$ -Arginina 0,05% (Sigma®); L- $\alpha$ -Metionina 0,05% (Sigma®); L- $\alpha$ -Tirosina 0,075% (Sigma®); L- $\alpha$ -Isoleucina 0,075% (Sigma®); L- $\alpha$ -Lisina 0,075% (Sigma®); L- $\alpha$ -Fenilalanina 0,125% (Sigma®); L- $\alpha$ -Valina 0,375% (Sigma®); L- $\alpha$ -Ácido Aspártico 0,25% (Sigma®); L- $\alpha$ -Ácido Glutâmico 0,25% (Sigma®);
- Adenina 0,025% em NaOH 10mM (Sigma®)
- Uracilo 0,025% em NaOH 10mM (Sigma®)
- L- $\alpha$ -Tryptofano 0,05% (Sigma®)
- L- $\alpha$ -Leucina 0,1% (Sigma®)
- L- $\alpha$ -Serina 0,4% (Sigma®)
- L- $\alpha$ -Histidina 0,1% (Sigma®)
- L- $\alpha$ -Treonina 0,2% (Sigma®)

##### Meio Sólido

Preparar BactoAgar (BD®) a 2% e autoclavar a 121° C durante 20 minutos. Adicionar os componentes na mesma proporção do meio líquido ao BactoAgar liquefeito.

Os meios foram preparados por diluição a partir de soluções *stock*. As soluções *stock* de aminoácidos, bases e Glucose 40% foram esterilizadas por autoclavagem a 110°C durante 20 minutos. As soluções *stock* de SC *mix* e YNB foram esterilizadas por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos. A esterilização nem sempre é feita a 121°C pois alguns dos componentes das soluções precipitam ou oxidam mais rapidamente quando sujeitos a essa temperatura.

#### **Solução de desagregação pH8**

- Tris-HCL 10mM
- EDTA-Na<sub>2</sub> 5mM

#### **PBS pH7,2 (pH ajustado com NaOH)**

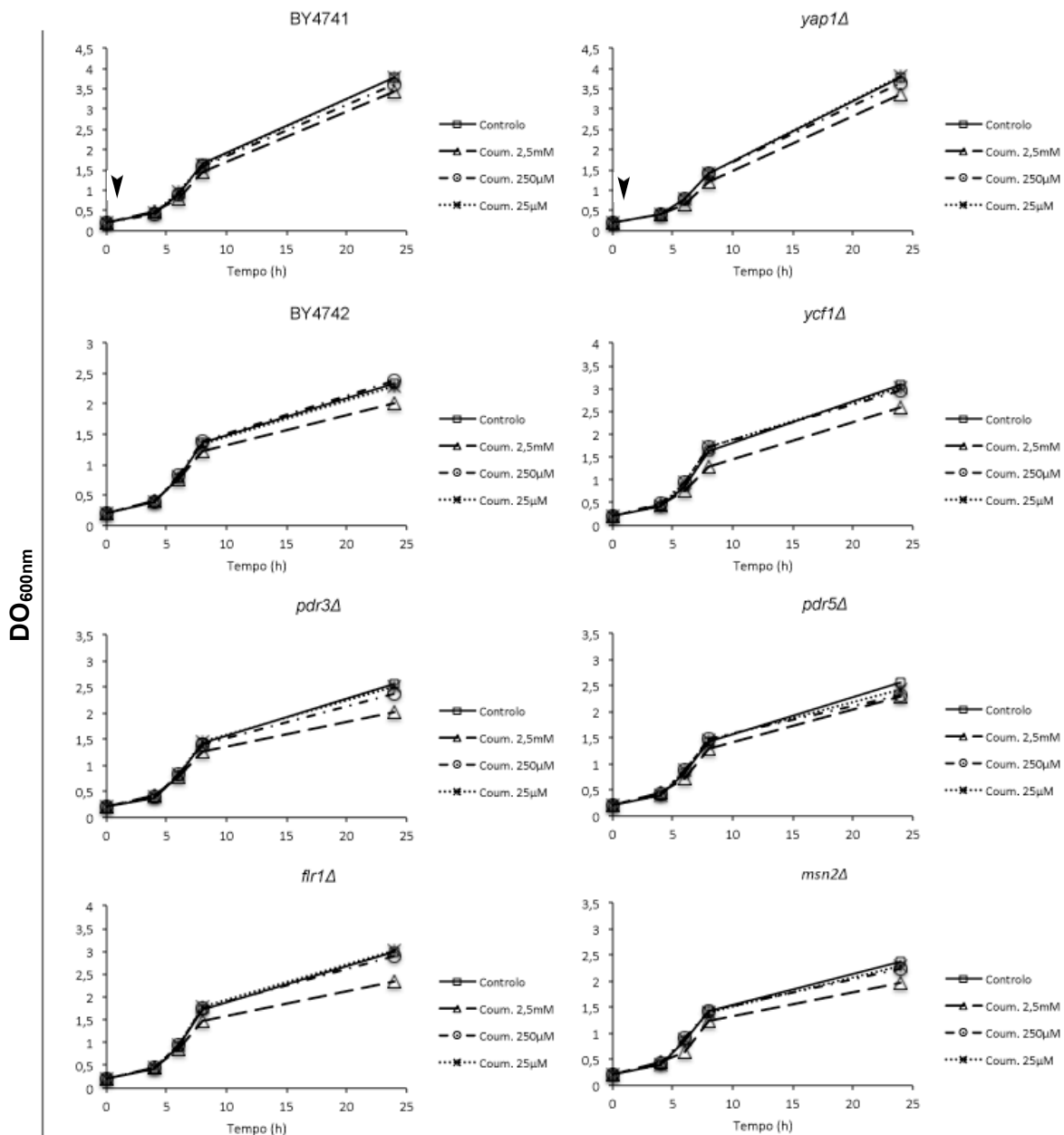
- NaCl 130 mM
- KCl 2mM
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM
- EGTA 10mM
- MgCl<sub>2</sub> 2mM

A solução de desagregação foi esterilizadas por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos e o PBS por filtração.

## 6.2 ENSAIOS PRELIMINARES

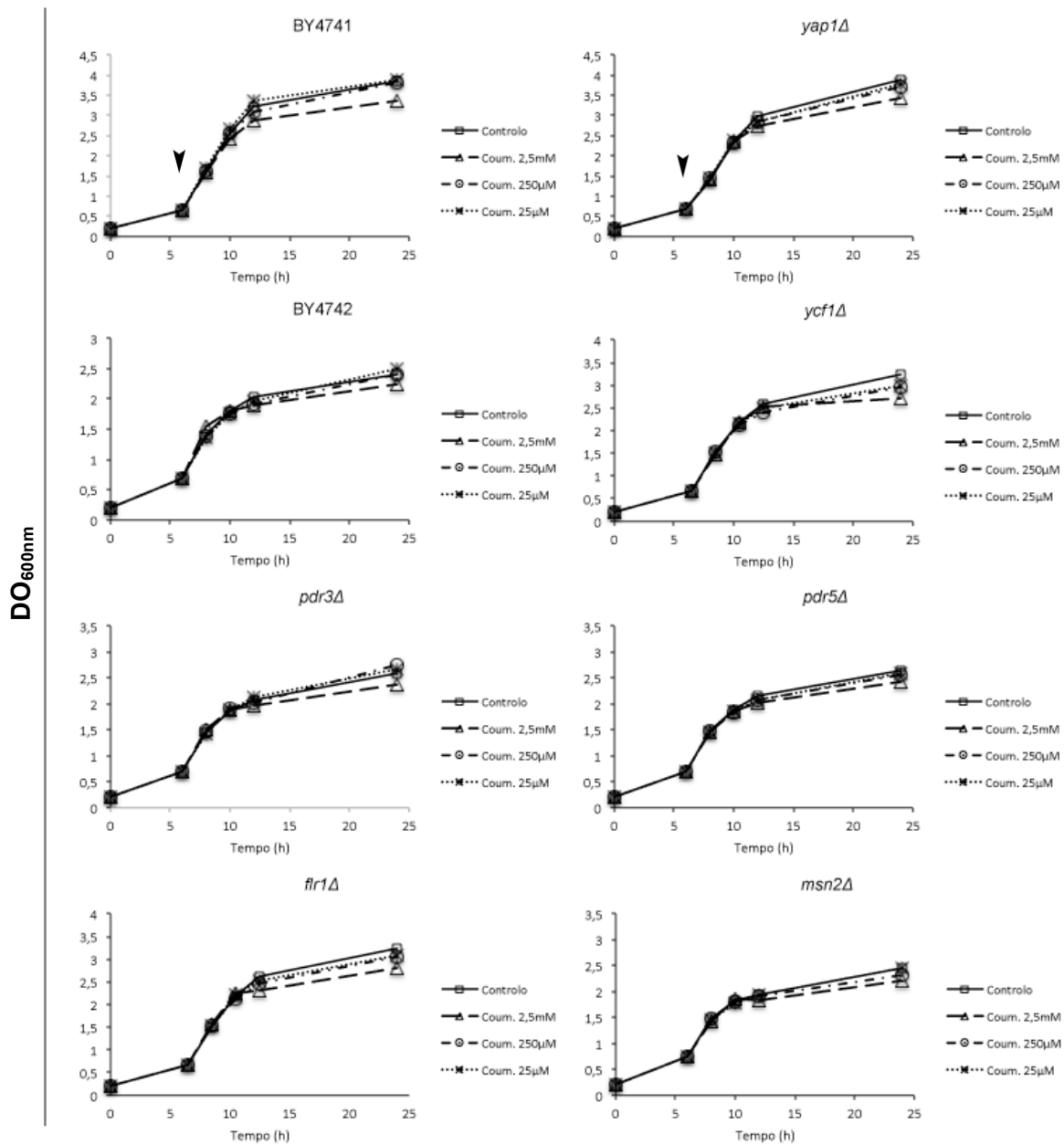
Ensaio preliminares efectuados para seleccionar a concentração dos compostos coumarina e umbeliferona e o tipo de abordagem a utilizar neste trabalho. Avaliação da sensibilidade das estirpes indicadas, através de curvas de crescimento, na presença de coumarina (**A** e **B**) ou umbeliferona (**C** e **D**), nas concentrações de 2,5mM, 250μM e 25 μM, conforme material e métodos. Em todos os ensaios foram incluídas culturas controlo (apenas com o solvente). As setas indicam o momento da adição do composto (início da cultura – **A** e **C**; fase de crescimento exponencial **B** e **D**). Os resultados representam os valores médios de um ensaio com duas réplicas biológicas.

**A**

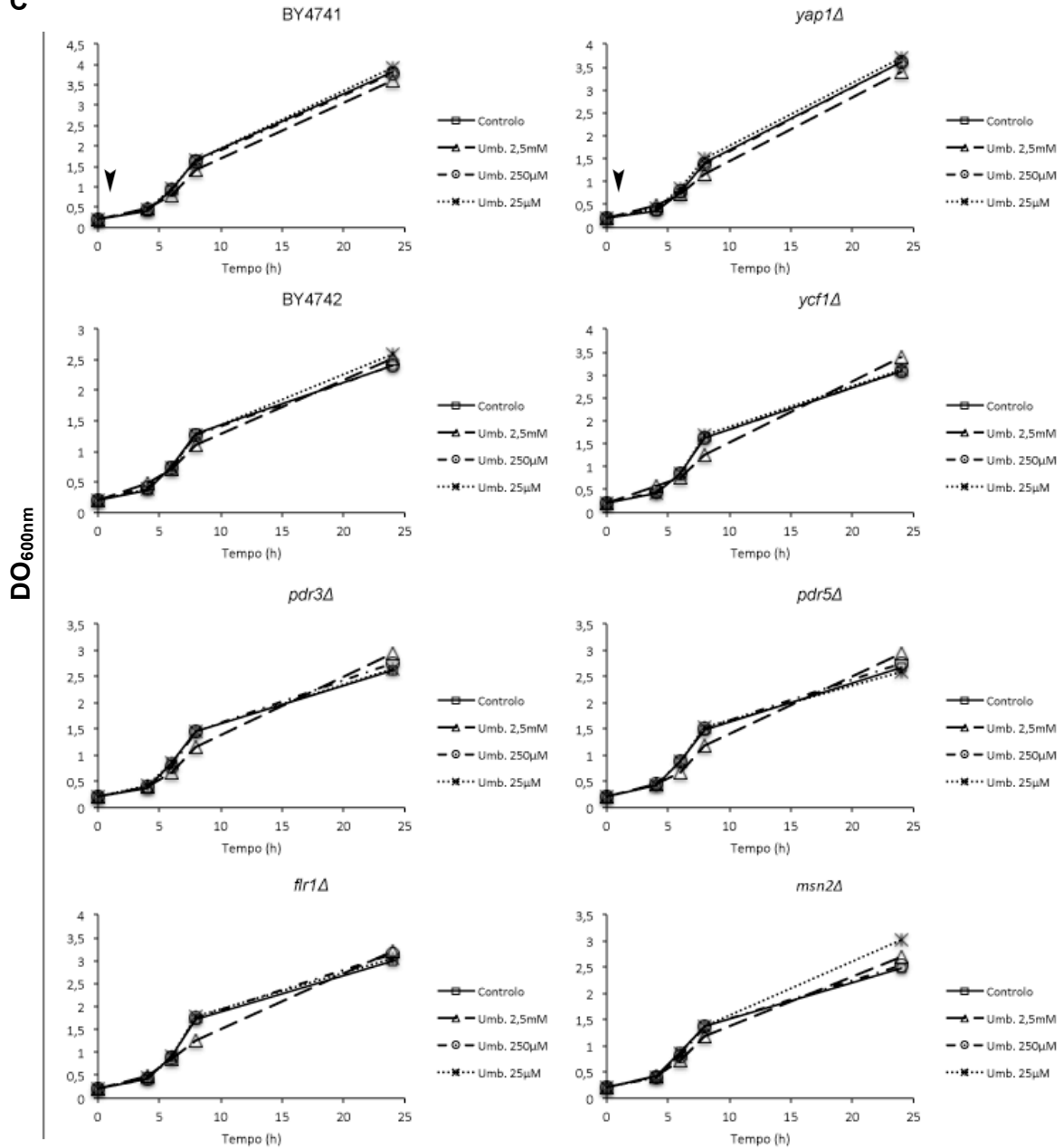




**B**



C



D

